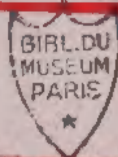
ISSN 0181-1584

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 13 Fascicule 3 1992



PUBLICATION TRIMESTRIELLE
AVEC LE CONCOURS DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Septembre 1992

CRYPTOGAMIE
Mycologie

ANCIENNE REVUE DE MYCOLOGIE
Fondée par R. Heim en 1936

Directeur scientifique: Mme J. Nicot
Secrétaire de Rédaction: Mme M.C. Boisselier
Editeur: A.D.A.C. - 12 rue Buffon F-75005 Paris.

MANUSCRITS

Les manuscrits doivent être adressés directement à un membre du Bureau de Rédaction, choisi pour sa spécialité. Le Bureau peut demander l'avis d'un lecteur, même s'il n'appartient pas au Comité de Lecture. Bien qu'étant une revue de langue française, les articles rédigés en anglais, allemand, italien et espagnol sont acceptés. Les disquettes de micro-ordinateur (IBM, IBM compatible, et MacIntosh) sont vivement souhaitées. Les recommandations aux auteurs sont publiées dans le fascicule 1 de chaque tome. Les auteurs recevront 25 tirés-à-part gratuits; les exemplaires supplémentaires seront à leur charge.

TARIFS DES ABONNEMENTS Tome 13, 1992

CRYPTOGAMIE comprend trois sections: Algologie, Bryologie-Lichénologie, Mycologie.

Pour une section:	France: (326 F ht) 332,85 F ttc	- Étranger: 357,00 F
Pour les 3 sections:	France: (918 F ht) 937,28 F ttc	- Étranger: 1000,00 F

Paiement par cheque bancaire ou postal à l'ordre de:
A.D.A.C. - CRYPTOGAMIE (CCP La Source 34 764 05 S),
adressé à: A.D.A.C. 12, rue Buffon, F-75005 Paris.

CRYPTOGAMIE, Mycologie est indexé par *Biological Abstracts, Current Contents,* Publications bibliographiques du CNRS (Pascal).

CRYPTOGAMIE

MYCOLOGIE

TOME 13 FASCICULE 3 1992

RÉSEAU DE MYCOLOGIE

27-28 janvier 1992

Institut Pasteur, Paris

CONTENTS





LES CHAMPIGNONS AGENTS DE LUTTE BIOLOGIQUE CONTRE LES MAUVAISES HERBES

Guy DURRIEU* et Siraj HASAN**

*Laboratoire Botanique et forestier, Université Paul Sabatier - Toulouse
**Biological Control Unit CSIRO - Montpellier

RÉSUMÉ - Les potentialités présentées par les champignons pathogènes comme agents de lutte contre les mauvaises herbes sont déjà largement prouvées. Le mode d'action des espèces utilisées se situe essentiellement à deux niveaux: - affaiblissement démographique de la population, - baisse de la compétitivité individuelle vis-à-vis des plantes à protéger. Cette lutte se développe actuellement sous deux formes stratégiques différentes, correspondant en fait à des situations bien distinctes. - Ou bien on se trouve en présence d'une plante introduite qui en raison de son origine exotique ne possède pas d'ennemis naturels locaux et envahit des habitats très diversifiés. L'importation d'organismes pathogènes choisis dans son aire d'origine, et se répandant naturellement, ramène le pouvoir concurrenciel de la plante à un niveau acceptable. L'exemple type en est fourni par *Puccinia chondrillina* contre *Chondrilla juncea* en Australie. Les expérimentations sur quelques autres espèces sont d'autre part très avancées. - Ou bien il s'agit d'une plante souvent autochtone, particulièrement favorisée par les méthodes culturales: l'application localisée et massive d'un inoculum local permet sa destruction là où elle est indésirable. Cela a conduit au développement récent d'un certain nombre de "mycoherbicides" tel celui constitué par des spores de *Colletotrichum gloeosporoides* fa. sp. *aeschynomenes*. L'avenir devrait voir le développement de méthodes intégrées combinant l'intervention synergisante de plusieurs agents biologiques, ou d'un agent biologique combiné avec un herbicide. Quant à la production d'organismes modifiés par enginerie génétique (destruction des phytoalexines, masquage des éliciteurs...) leur emploi relève encore de la prospective à long terme.

ABSTRACT - Potentialities of plant parasitic fungi as biological control agents against weeds are actually successfully proved. The efficacy of the involved species acts through two main ways: weakening of the population demography, lowering of individual competitivity against the cultivated plant. At present, biological control with fungi proceeds along two different strategies according to two well distinct situations: - Either the weed to fight is an introduced species that, according to its exotic origin, has no native ennemies and invades a lot of different habitats. Introducing a pathogenic fungus, selected in its area of origin and able to widespread by itself, lowers the weed competitivity to a tolerable level. A typical example is *Puccinia chondrillina* introduced in Australia to control *Chondrilla juncea*. Tests on some other species are also very advanced. - Either the control concerns a native weed which is expanding owing to tilling methods or to herbicide-resistance. A massive inoculation with a host specific indigenous fungal pathogen allows to kill the weed where its presence is undesirable. This inundative method is achieving with formulation of "mycoherbicides" such as the one based on spores of *Colletotrichum gloeosporioides* fa. *aeschynomenes*. In the future integrated control methods combinating the synergic action of several biological agents or of a biological agent with a chemical compound would be improved. About the production of modified organisms by genetic engineering (changes in host specificity by inhibition of phytoalexins or masking of elicitors) it is a matter of longer prospect.

MOTS CLÉS : Lutte biologique, malherbologie, mycoherbicides.

INTRODUCTION

Les nuisances provoquées par la présence de plantes adventices proviennent essentiellement des effets de compétition exercés au détriment des cultures ou de la végétation jugée utile. Il s'agit donc de supprimer ou de renverser ce pouvoir de compétition à l'avantage de la plante à protéger. Pendant très longtemps les agriculteurs se sont trouvés relativement désarmés devant les mauvaises herbes. Les moyens mis en oeuvre étaient le tri des semences et, pendant la période de végétation, l'arrachage et le sarclage.

Ce n'est qu'au début des années 1950 que la lutte chimique par les herbicides a fait son apparition. Depuis, son développement a été tel qu'aujourd'hui les produits de désherbage représentent la plus grosse part de la production phytosanitaire et le premier chapitre budgétaire des agriculteurs pour la défense de leurs cultures. A l'élévation des coûts de production viennent s'ajouter d'autres inconvénients:

- D'abord la phytotoxicité: si les produits mis au point ont fait de très larges progrès du point de vue sécurité d'emploi, leur utilisation reste toujours relativement délicate, on peut vite atteindre les doses toxiques pour la culture. La modification de la flore représente aussi un problème important, certaines adventices ont été très facilement détruites par les herbicides, au point même qu'il est des espèces que l'on peut presque considérer comme éradiquées: le Bleuet *(Centaurea cyanus)* en est un des exemples les plus "visibles".

En revanche d'autres plantes plus résistantes ont pris les places laissées vacantes et la flore des adventices des grandes cultures n'est plus du tout la même qu'il y a moins d'un demi-siècle. Il est donc nécessaire d'ajuster l'arsenal chimique disponible contre ces nouveaux envahisseurs.

Plus grave, on constate l'apparition de génotypes résistants chez des espèces de plus en plus nombreuses, ils peuvent supporter des concentrations 5 ou 6 fois plus élevées que les types sauvages. La première observation semble concerner *Senecio vulgaris* (Ryan, 1970), mais le nombre d'espèces concernées doit aujourd'hui largement dépasser la cinquantaine (Holt & Le Baron, 1989; Itoh & Matsunaka, 1990; De Prado et al., 1989). L'une des méthodes envisagées pour combattre cette adaptation paraît inquiétante. Il s'agit de sélectionner des cultivars hautement résistants à l'herbicide (Shah, 1986), des tolérances à des doses 1000 fois supérieures aux concentrations habituelles ont été obtenues. Ainsi l'utilisation massive du produit éviterait toute adaptation. Outre le fait que la chose n'est pas du tout certaine en raison des décroissances de doses possibles sur les bordures, on peut poser la question du devenir des résidus dans l'environnement. Vient évidemment s'ajouter l'aspect économique de la maitrise des productions de semences par un petit nombre d'entreprises phytosanitaires et l'augmentation du coût de production intolérable pour les pays les moins développés.

Il paraît donc indispensable de rechercher de nouvelles solutions, la lutte biologique est une des possibilités. Même si l'action des antagonistes naturels ne détruit pas complètement la mauvaise herbe, elle peut ramener les effets de celle-ci à un niveau économiquement tolérable.

L'action parasitaire d'un champignon peut bien souvent par son action dépressive réaliser cette opération. Par exemple, du blé cultivé pendant 2 mois

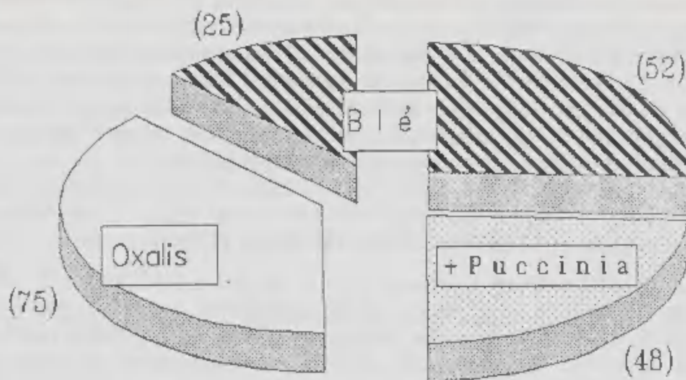


Fig. 1: Biomasse produite (en %) par deux plantes cultivées en compétition, blé *(Triticum aestivum)* et *Oxalis* sp. A gauche, l'*Oxalis* est sain, à droite (pointillé) il est parasité par *Puccinia oxalidis*.

Fig. 1: Biomass production by two plants grown in competition, wheat *(Triticum eastivum)* and *Oxalis* sp. Left: *Oxalis* healthy, right: *Oxalis* parasited by *Puccinia oxalidis*.

en concurrence avec un *Oxalis* produit une biomasse supérieure de près de 50% si ce dernier est attaqué par sa rouille *Puccinia oxalidis* (fig. 1).

Les problèmes posés proviennent d'un déséquilibre dans le fonctionnement des communautés végétales qui peuvent correspondre à deux types de situations, qui d'ailleurs ne s'excluent pas:

• Soit on est en présence d'une plante indigène (ou que l'on peut considérer comme telle à la suite d'une naturalisation ancienne). Elle peut se révéler très gênante dans certaines cultures, car les pratiques agricoles appliquées lui sont particulièrement favorables, autant, sinon plus qu'à la plante cultivée. L'action normale de ses ennemis naturels est insuffisante pour limiter son extension et sa multiplication.

Ce sont le plus souvent des espèces annuelles dont le cycle végétatif se calque sur celui de la plante cultivée comme:

- *Stelleria media, Sherardia arvensis, Anagallis arvensis* ou *Senecio vulgaris* en horticulture,

- *Matricaria inodora, Papaver rhaeas, Lolium perenne, Avena fatua* dans les céréales,

- *Setaria glauca, Panicum miliaceum, Echinochloa crus-galli* dans le maïs...

Plus rarement ce sont des plantes pérennes à rhizome profond comme *Cirsium arvense, Convolvulus arvensis* ou *Equisetum telmateia*.

• Soit il s'agit d'une plante exotique, introduite dans une région dont le climat lui convient, sans parasites ou prédateurs locaux. Elle prend une extension considérable dans les peuplements naturels et aussi très souvent dans les cultures.

Si nous n'avons pas de cas dramatiques chez nous (*Erigeron canadensis* ou plus récent, *Senecio harveyanus* ne sont pas très gênants), on a pu assister en revanche dans d'autres régions du globe à des invasions massives. *Lantana camara* ou *Eichornia crassipes* dans certaines zones tropicales, *Hypericum perforatum* ou *Chondrilla juncea* en Australie et dans l'Ouest américain, posent de sérieux problèmes. A tel point que ce sont ces plantes là qui ont les premières fait l'objet de programmes de lutte biologique.

MÉTHODES INTRODUCTIVES

Les précurseurs en la matière sont les Néo-Zélandais qui, dès 1916, tentèrent de combattre le chardon *Cirsium arvense* avec la rouille *Puccinia punctiformis*. Elle provoque des infections systémiques ayant pour effet de stériliser et dessécher les pousses et d'épuiser les rhizomes. Son action paraît donc particulièrement intéressante puisqu'elle agit à la fois sur l'appareil végétatif, et réduit donc son pouvoir de compétition, et sur la multiplication: suppression de la production de graine, élimination progressive des rhizomes.

Malheureusement ce tableau idéal est gaché du fait du faible taux d'infections systémiques naturelles: l'installation du champignon doit se faire pour cela au stade plantules d'où son efficacité limitée.

En revanche le modèle d'un programme réussi est celui de l'introduction en Australie de *Puccinia chondrillina* pour lutter contre *Chondrilla juncea*. Cette composée originaire de la région méditerranéenne, où elle est parfaitement inoffensive grâce à la présence de divers ennemis naturels (Wapshere et al., 1974, 1976), a envahi le Sud-Est australien avec un remarquable succès puisque dans certains cas sa densité pouvait atteindre plusieurs centaines d'individus au mètre carré.

Des observations dans la région méditerranéenne et des expérimentations réalisées dans le Sud de la France (Hassan & Wapshere, 1973; Wapshere et al., 1974, 1976) ont montré que la rouille *Puccinia chondrillina* avait un effet dépressif très marqué sur la population de la plante sous des conditions climatiques tout à fait comparables à celle de l'Australie.

Après contrôle de sa stricte spécificité (Hasan, 1972), son introduction en 1971 s'est révélée remarquablement réussie. En moins d'un an, à partir d'un unique point d'introduction, le champignon s'était répandu sur toute l'aire australienne de la plante (Hasan, 1974; Cullen et al., 1973). Réduisant de façon drastique les populations de l'adventice, c'était des millions de dollars d'économie pour les fermiers australiens (Cullen, 1985).

Cependant le problème n'était pas entièrement résolu. *Chondrilla juncea* est en effet une plante apomictique. Elle est présente en Australie sous trois formes (clones) différentes: l'une à feuilles étroites était très largement dominante, les deux autres à feuilles larges et feuilles intermédiaires plus rares. C'est la première qui fut testée pour sa sensibilité au parasite, la souche de *Puccinia* introduite se révéla non virulente pour les deux autres, d'où une évolution très rapide dans la composition des populations de *Chondrilla* (tableau 1).

Il fut rapidement remédié au problème par la sélection et l'importation de deux autres souches du champignon (Hasan, 1984). L'invasion du *Chondrilla* n'est plus qu'un mauvais souvenir (tableau 2).

Il semble qu'il en soit de même dans le Nord-Ouest américain (Adams & Line, 1984; Supkoff et al., 1988) où l'installation du parasite a pu se réaliser

d'une façon différente. En effet dans ces régions en raison d'hivers relativement rigoureux (moyenne de janvier au Washington - 5°C), ce sont les téliospores de la rouille qui réalisent la phase de conservation, et c'est leur germination avec production de basidiospores haploïdes qui assure le nouveau départ des infections. Ainsi les possibilités de recombinaisons génétiques ont permis au champignon de s'adapter aux divers clones de *Chondrilla*. Cela n'a pas été le cas en Australie, où en raison de la douceur des hivers, les urédospores assurent le maintien, uniquement par multiplication végétative. Tandis que les téliospores sans période froide pour lever leur dormance, ne peuvent jouer qu'un rôle négligeable si ce n'est nul. Les possibilités d'adaptation génétique de la rouille sont donc inexistantes.

Tableau 1: Evolution dans la composition des populations australiennes de *Chondrilla juncea* après la première introduction de *Puccinia chondrillina*. (E: type à feuilles étroites, M: à feuilles intermédiaires, L: à feuilles larges).

Table 1: Changes in Australian populations of *Chondrilla juncea* after the first introduction of *Puccinia chondrilla* (E: narrow leaved biotype, M: intermediate, L: broad leaved).

	1968			1980		
Types	E	M	L	E	M	L
Stations						
1	98%	0	2%	5	90	5
2	67%	30	3%	3	78	19
3	62%	24	14%	3	80	17
4	51%	10	39%	8	10	82

Tableau 2: Déclin des densités de *Chondrilla juncea* dans 4 régions d'infestation massive dans le S.E. de l'Australie (Hassan & Ayres, 1990).

Table 2: Decline in density of *Chondrilla juncea* in the 4 major infested regions of S.E. Australia.

	Canberra	Wagga	Mallee	Tamworth
1971	233 pieds/m^2	173	225	40
1975	59	51	87	0
1979	23	6	12	1
1983	6	3	27	
1986	2	1	16	0

Un autre exemple de succès dans l'utilisation d'une rouille est celui de l'introduction au Chili de *Phragmidium violaceum* pour combattre les ronces de provenance européenne (Oehrens & Gonzales, 1977). Cette espèce vient d'être aussi amenée en Australie.

Ainsi existe-t-il actuellement toute une série de travaux, à des stades divers d'avancement sur l'utilisation d'autres parasites, suivant des méthodes identiques:

- *Puccinia barbeyi* contre *Asphodelus fistulosus* (Australie)

- *Uromyces heliotropii* et *Cercospora heliotropii-bocconi* contre *Heliotropium europeum* (Australie)

- *Cercosporella ageratina* contre *Eupatorium riparium* (Hawaï)

- *Puccinia jaceae* contre *Centaurea diffusa* (Amérique du Nord)

- *Puccinia carduorum* contre *Carduus pycnocephalus* et *Carduus tenuiflorus* (Amérique du Nord et Australie)

MÉTHODES INONDATIVES

Mais comme nous l'avons déjà indiqué, on peut se trouver confronté à des problèmes radicalement différents: ceux posés par des plantes indigènes qui deviennent envahissantes pour certaines cultures.

On peut imaginer d'essayer d'avoir recours à des parasites exotiques vivants sur des espèces voisines, et pour lesquels ces nouveaux hôtes ne présenteraient pas de résistance.

Cette voie, à ma connaissance, n'a pas été explorée. Les recherches et les applications se sont orientées vers une autre direction, par l'utilisation de méthodes inondatives et ont débouché sur la mise au point de "mycoherbicides".

La première tentative dans le domaine a été réalisée semble-t-il, par des forestiers américains. Ils ont inoculé un parasite indigène: *Ceratocystis fagacearum* pour éliminer des chênes de faible intérêt forestier qui concurrencent le développement des peuplements de *Pinus bankisiana* dans le centre du Minnesota (French & Schroeder, 1969). Cet agent biologique de débroussaillement s'est révélé d'une efficacité supérieure aux agents chimiques avec un coût d'application inférieur.

Mais les utilisations les plus spectaculaires, concernent la lutte contre les adventices de culture. Il s'agit de répandre en grande quantité des suspensions de spores d'un parasite hautement virulent et spécifique sur les cultures envahies par la plante indésirable. Les infestations massives obtenues ont un effet fortement dépressif sur l'adventice. La première application mise au point a été obtenue avec la Melanconiale *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomenes*, pour combattre *Aeschynomene virginica*. C'est une légumineuse envahissante dans les champs de riz et de soja dans le bassin du Mississipi. Ce sont deux situations où l'emploi d'herbicides chimiques est délicate. Champs immergés d'une part, proche parenté entre la culture et l'adventice de l'autre. La pulvérisation de suspensions de spores sur les plantes à éliminer se révèle particulièrement efficace: le taux de mortalité peut atteindre 98%, et se maintient à une moyenne de 85% (Daniel et al., 1973; Smith & Shaw, 1966).

Le champignon est commercialisé sous l'appellation "Collego". Il s'agit là d'une stratégie de lutte profondément différente de la première décrite, que l'on pourrait qualifier de classique. Elle nécessite à priori des recherches préliminaires sur le choix de l'agent moins complexes que dans le cas d'introductions. En revanche d'autres problèmes se posent: culture du champignon pour la production en masse des propagules, conservation de ces propagules, spécification des agents dispersan', mouillant, support de la préparation commerciale. Ces derniers, par un choix judicieux peuvent augmenter très notablement l'efficacité du champignon. Amsellem et al. (1990), ont montré avec *Alternaria cassiae* qu'il fallait atteindre un seuil d'au moins 20 conidies par gouttelette d'eau pure pulvérisée pour obtenir des infections sur *Cassia obtusifolia*. Si la suspension de spores est réalisée dans une émulsion huiles-lecithine l'efficacité est maximale dès lors qu'il y a une spore par gouttelette.

Depuis le "Collego" un certain nombre d'autres champignons ont été mis en oeuvre de la même façon. On peut citer pour l'Amérique du Nord:

- le "Devine", souche de *Phytophthora palmivora* spécifique du *Morrenia odorata*, Asclepiadacée lianescente qui envahit les vergers d'agrumes en Floride.

- le "Casst", *Alternaria cassiae* dirigé contre *Cassia* sp., principalement dans les cultures de coton.

- le "Luboa", *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *cuscutae*.

- le "Velgo", *Colletotrichum coccodes* contre *Abutilon theophrasti* dans les maïs et soja (mais ne peut être utilisé dans les champs de coton, celui-ci étant un hôte potentiel).

- Il faut également citer l'utilisation en Hollande du Basidiomycète *Chondrostereum purpureum* pour enrayer la multiplication du *Prunus serotina*: 90% des souches sont détruites après avoir été infectées par des éléments mycéliens. Il ne paraît pas y avoir de danger de diffusion du parasite vers les vergers (Scheepens & Hoogerbrugge, 1989).

PERSPECTIVES

Si de nombreuses recherches sont en cours pour tester les potentialités de divers champignons, il faut aussi se rendre compte que tous les problèmes ne pourront être réglés par l'utilisation d'un seul antagoniste. Et la notion de lutte intégrée, combinant l'action de plusieurs facteurs peut souvent être d'une grande efficacité. La combinaison peut d'ailleurs concerner d'autres champignons, des insectes ou bactéries, ou des herbicides.

L'idée d'associer plusieurs champignons vient d'un certain nombre d'observations montrant que l'attaque d'un parasite, comme une rouille, peut ouvrir la voie à un nécrotrophe, comme *Botrytis cinerea*. Alors que les dégâts occasionnés par le premier seront faibles, l'action du second peut conduire à la destruction de la plante (voir Hasan & Ayres, 1990 pour divers cas).

L'utilisation simultanée d'un parasite et d'un herbicide chimique peut donner aussi des résultats tout à fait intéressants. Par exemple pour *Cassia obtusifolia*, Quimby & Boyette (1986) ont montré que *Alternaria cassiae* inoculé au premier stade foliaire élimine 58% des plantes, tandis que l'Imazaquine diminue leur poids sec de 32% sans les tuer. Mais les deux agents combinés réduisent la population de 96%.

Enfin peut-on envisager de modifier les organismes utilisés pour améliorer leur efficacité ? Les méthodes d'enginerie génétique permettent de penser à diverses voies possibles:

- augmenter le pouvoir pathogène des agents utilisés en leur permettant de produire des enzymes détruisant les parois cellulaires ou neutralisant les phytoalexines ou bien encore en leur conférant des propriétés toxinogènes.

- obtenir des souches d'organismes nécrotrophes rendues spécifiques pour une plante donnée: Miller et al. (1987) ont produit ainsi des *Sclerotinia sclerotiorum* spécifiques.

Mais tout cela est encore essentiellement du domaine de la prospective et fort loin du domaine d'application.

CONCLUSION

Il est certain que longtemps encore les agriculteurs auront besoin des herbicides. La lutte biologique à elle seule n'est pas capable de résoudre tous les problèmes de la malherbologie.

Mais il est tout aussi certain qu'elle mériterait plus de soutiens qu'elle n'en reçoit actuellement. Les avantages retirés seraient multiples:

- solution de certains problèmes de résistance sans avoir à augmenter les doses et donc moindres coûts pour l'agriculteur,

- respect accrû de l'environnement naturel et humain,

- diminution des doses de résidus dans l'alimentation.

Enfin il est certain aussi que dans le cas des espèces envahissantes, en particulier dans les régions tropicales, la lutte biologique représente le seul moyen efficace de venir à bout du problème.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMS E.B. and LINE R.F., 1984 - Epidemiology and host morphology in the parasitism of rush skeletonweed by *Puccinia chondrillina*. *Phytopathology* 74: 745-748.

AMSELLEM Z., SHARON A., GRESSEL J. and QUIMBY P.C., 1990 - Complete abolition of high inoculum threshold of two mycoherbicides (*Alternaria crassa* and *Alternaria cassiae*) when applied in invert emulsion. *Phytopathology* 80: 925-929.

CULLEN J.M., KABLE P.F. and CATT M., 1973 - Epidemic spread of a rust imported for biological control. *Nature* 244: 462-464.

CULLEN J.M., 1985 - Bringing the cost benefit analysis of biological control of *Chondrilla juncea* up to date. Proceed. 6th. intern. Symp. Biological control weeds: 145-152. Agriculture Canada.

DANIEL J.T., TEMPLETON G.E., SMITH R.J. and FOX W.T., 1973 - Biological control of northern jointvetch in rice with [redacted] endemic fungal disease. *Weed Sci.* 21: 303-307.

DE PRADO R., DOMINGUEZ C. and TENA M., 1989 - Characterization of Triazine-resistant biotypes of common lambsquarters *(Chenopodium album)* hairy fleabane *(Conyza bonariensis)* and yellow foxtail *(Setaria glauca)* found in Spain. *Weed Sci.* 37: 1-4.

FRENCH I.W. and SCHROEDER D.B., 1969 - The oak wilt fungus *Ceratocystis fagacearum* as [redacted] selective silvicide. *Forest Sci.* 15: 198.

HASAN S., 1972 - Specificity and host specialisation of *Puccinia chondrillina*. *Ann. Appl. Biol.* 72: 257-263.

HASAN S. and WAPSHERE A.J., 1973 - The biology of *Puccinia chondrilla*, a potential biological control agent of skeleton weed. *Ann. Appl. Biol.* 74: 325-332.

HASAN S.,1974 - First introduction of a rust fungus in Australia for the Biological control of skeleton weed. *Phytopathology* 64: 253-254.

HASAN S., 1984 - Recherche de souches virulentes de *Puccinia chondrillina* pour la lutte biologique contre la mauvaise herbe *Chondrilla juncea*. 26° colloque S.F.P., *Les Colloques de l'INRA* 26: 167-171.

HASAN S. and AYRES P.G.,1990 - The control of weeds through fungi: principles and prospects. *New Phytol.* 115: 201-222.

HOLT J.S. and LE BARON H.M., 1989 - Significance and worldwide distribution of herbicide resistance. *Abs. Weed Sci. Soc. Americ.* 131.

ITOH K. and MATSUNAKA S., 1990 - Parapatric differentiation of paraquat resistant biotypes in some compositae species. *In:* S. KAWANO, *Biological approaches and evolutionary trends in plants.* Acad. Press. 33-49.

MILLER R.V., FORD E.J. and SANDS D.C., 1987 - Reduced host range mutants of *Sclerotinia sclerotiorum. Phytopathology* 77: 1695.

OEHRENS E.B. and GONZALES S.M., 1977 - Dispersion, ciclo biologico y danos causados por *Phragmidium violaceum* en zarzamora. *Agro Sur (Chili)* 5: 73-85.

QUIMBY P.C. and BOYETTE C.D., 1986 - *Alternaria cassiae* can be integrated with selected herbicides. *Weed Sci. Soc. Soc. Amer.* 26: 52.

RYAN G.F., 1970 - Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Sci.* 18: 614-616.

SCHEEPENS P.L. and HOOGER BRUGE A., 1989 - Control of *Prunus serotina* in forests with the endemic fungus *Chondrostereum purpureum.* Proc. 7th. Intern. Symp. Biological Control of Weeds, Rome: 545-552.

SHAH D.M., 1986 - Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481.

SMITH R.J. and SHAW W.C., 1966 - Weeds and their control in Rice production. *Agricultural Handbook* n° 292. U.S.D.A.

SUPKOFF D.M., JOLEY D.B. and MAROIS J.J., 1988 - Effect of introduced biological control organisms on the density of *Chondrilla juncea* in California. *J. Appl. Ecol.* 25: 1089-1095.

WAPSHERE A.J., HASAN S., WAHBA W.K. and CARESCHE L., 1974 - The ecology of *Chondrilla juncea* in the western Mediterranean. *J. Appl. Ecol.* 11: 783-800.

WAPSHERE A.P., CARESCHE L. and HASAN S., 1976 - The ecology of *Chondrilla juncea* in the eastern Mediterranean. *J. Appl. Ecol.* 13: 545-553.

Source : MNHN, Paris

MYCOTOXINOGÉNÈSE DE SOUCHES DE *FUSARIUM*: CONTRAINTE EN VUE DE LEUR UTILISATION DANS LA LUTTE BIOLOGIQUE

DUPUY Jacques, LE BARS Joseph et LE BARS Pierrette

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie INRA, 180 Chemin de Tournefeuille 31300 Toulouse.

RÉSUMÉ - Les souches de *Fusarium* dispersées dans l'environnement en vue de la lutte biologique peuvent contaminer secondairement des denrées alimentaires. Or, différentes mycotoxines peuvent être élaborées par de nombreuses espèces de ce genre. La toxinogenèse de 73 souches, isolées de différentes denrées alimentaires (céréales, fruits et légumes, ...) a été éprouvée *in vitro*. La fusarochromanone ne fut détectée dans aucune souche; la zéaralénone et le déoxynivalénol furent produits respectivement par 59 et 12,3 % des isolats; malgré une fréquence significative (14 %), le risque potentiel de contamination par les trichothécènes dermonécrosants apparaît faible. Dans les cultures de 2 souches sélectionnées pour la lutte biologique, aucune des mycotoxines recherchées ne fut détectée. Une telle vérification de la non-toxigénicité des souches fait intégralement partie de la domestication des Micromycètes.

ABSTRACT - The spreading of *Fusarium* in the environment, for the biological control, can lead to a secondary contamination of the foodstuffs. Furthermore, many species of the genus *Fusarium* can elaborate different mycotoxins. The toxinogenesis of 73 strains, isolated from various foodstuffs (cereals, fruits and vegetables, ...) has been tested *in vitro*. Fusarochromanone wasn't detected in any strains; zearalenone and deoxynivalenol were produced respectively by 59 and 12,3 % of the isolates; despite a significative frequency (14 %), the potentiel hazard of contamination with the skin necrotizing trichothecenes appears low. In the cultures of 2 strains selected for the biological control, none of those mycotoxins were detected. This checking study concerning the non-toxigenicity of strains is a required step to allow the domestication of Micromycetes.

MOTS CLÉS : *Fusarium*, mycotoxines, lutte biologique.

INTRODUCTION

Parmi les différentes utilisations des Micromycètes se développant actuellement, des expérimentations basées sur l'emploi de souches de *Fusarium* non pathogènes permettent d'envisager ce procédé comme moyen de lutte biologique contre les fusarioses des cultures maraîchères et florales (Alabouvette et al., 1987).

Avant de disperser de telles souches dans l'environnement, il convient de s'assurer non seulement qu'elles ne sont pas pathogènes pour l'homme ou les animaux mais aussi qu'elles soient atoxinogènes sur les denrées alimentaires, notamment les céréales (Le Bars, 1982), qu'elles peuvent contaminer dans un second temps. En effet, les espèces du genre *Fusarium*, largement réparties sur

tout le globe, sont connues pour leur capacité à infecter les produits agricoles en particulier les grains (Nelson et al., 1981; Booth, 1984). La plupart des espèces de *Fusarium* ont été rapportées comme productrices de mycotoxines (Marasas et al., 1984; Chelkowsky, 1989), principalement la zéaralénone (Mirocha et al., 1971; Di Menna et al., 1987), les trichothécènes non macrocycliques (Pathre & Mirocha, 1979; Ueno, 1983; Snyder, 1986; Grove, 1988) et plus récemment la fusarochromanone (Pathre et al., 1986). Plusieurs autres toxines ont été caractérisées dans le genre *Fusarium* (Vesonder & Golinski, 1989).

Afin de limiter de tels risques dans la perspective du développement de l'emploi de souches de *Fusarium* pour la lutte biologique, il a été recommandé par la Commission Nationale de Toxicologie que la non toxinogénicité de ces souches soit examinée.

Pour effectuer le choix des toxines à rechercher, nous avons tenu compte tout d'abord des principales voies de biosynthèse des mycotoxines (Steyn, 1980) reconnues comme contaminants naturels dans différentes régions du monde, notamment en Europe (Gareis et al., 1989); d'autre part, il convenait de prendre en compte la mycotoxinogénèse effective des souches de *Fusarium* isolées de grains de nos principales céréales.

En conséquence, après avoir mis au point un protocole expérimental prenant en compte la diversité des conditions optimales de toxinogénèse *in vitro* et des méthodes d'analyse, nous avons examiné l'aptitude de l'ensemble de ces souches, "domestiquées" et "sauvages", à produire les mycotoxines retenues: zéaralénone, fusarochromanone, déoxynivalénol et trichothécènes dermonécrosants.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Aspects mycologiques

Les souches de *Fusarium* (n = 73) provenaient de blé (38), maïs (13), tubercules (6), fruits et légumes (5), sol (2)... La plupart nous furent données par l'Institut Technique des Céréales et Fourrages (Baziège, Hte Garonne) et l'Unité de Phytopathologie de l'Université Catholique de Louvain; les autres furent isolées de maïs au laboratoire.

Les deux souches destinées à la lutte biologique étaient issues de travaux effectués à l'Institut National de Recherche Agronomique (Alabouvette et al., 1987) et développées par une entreprise.

B. Epreuve de toxinogénèse

D'après l'ensemble des données bibliographiques (Eugenio et al., 1970; Greenhalgh et al., 1983; Xie et al., 1989) ainsi que des essais préalablement effectués dans notre laboratoire sur la zéaralénone (**Z**), la fusarochromanone (**F**), le déoxynivalénol (**D**) et les trichothécènes dermonécrosants (**TD**), les conditions optimales retenues pour l'épreuve de toxinogénèse furent les suivantes:

- milieu solide granulaire: 30 g de riz (Uncle Ben's) autoclavé (120°C, 10 mn), teneur en eau = 50%, en erlenmeyers de 100 ml;

- 4 semaines d'incubation: 2 semaines à 28°C suivies d'1 semaine à 20°C et enfin 1 semaine à 12°C. Cette séquence de température favorisant respectivement la production de (**D**), (**F**) et (**Z**) enfin des (**TD**). Deux séries

d'erlenmeyers furent ensemencées pour tenir compte des 2 techniques d'extraction.

C. Techniques analytiques

Extraction: macération à 20°C pendant 48 heures avec 50 ml de l'un des mélanges:

- méthanol - eau - ammoniaque (MeOH - H_2O - NH_4OH) (90: 10: 2, → E1;

- acétonitrile - eau (C_2H_3N - H_2O) (90: 10) → E2.

Purification:

1. Partition liquide - liquide:

• pour la (F): (a) 14 ml F_1 additionné de 11 ml H_2O (→ MeOH 50%),
(b) délipidation par l'isooctane (2 ■ 15 ml),
partition contre le chloroforme ($CHCl_3$): 25 puis 10 ml,
(c) déshydratation de la phase $CHCl_3$ (filtre séparateur de phase Whatman),
(d) concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif, reprise quantitative par $CHCl_3$, évaporation à sec sous azote (N_2),
(e) reprise finale par 100μl $CHCl_3$ - C_2H_3N (80: 20).

• pour les (TD):(a) 25 ml E_2,
(b) addition de 10 ml H_2O à 5% KCl avant délipidation,
(c) déshydratation par Na_2SO_4 anhydre,
(d) comme pour (F),
(e) reprise finale par 125μl acétone.

2. Chromatographie d'absorption sur minicolonnes (Trucksess et al., 1984 modifiée par Eppley et al., 1986):

• pour le (D): (a) 20 ml E_2,
(b) colonne conditionnée par 10 ml C_2H_3N - H_2O (90: 10), débit = 2 ml/mn, puis élution par 10 ml C_2H_3N - H_2O (90: 10),
(c) déshydratation par partition contre 30 ml $CHCl_3$ puis passage sur filtre séparateur de phase,
(d) comme pour (F),
(e) reprise finale par 100 ml $CHCl_3$ - C_2H_3N (80: 20).

• pour la (Z): colonne précédente amenée à sec puis,
(b) élution par 40 ml $CHCl_3$ - C_2H_5OH (95: 5),
(d) déshydratation par passage sur filtre séparateur de phase,
(d) comme pour (F),
(e) reprise finale par 100μl C_6H_6 - C_2H_3N (90: 10).

La séparation et la quantification furent réalisées par Chromatographie Planaire Instrumentalisée sauf pour les (TD), révélés par leur activité dermonécrosante sur l'animal.

Les dépôts (5μl) furent effectués sur des plaques de gel de silice 60 (20 x 20 Merck, n° 5553) à l'aide de micropipettes à usage unique (Microcaps, Drummond). Du fait de la diversité des toxines recherchées et des métabolites

fongiques pouvant interférer lors du dosage, nous avons eu recours à des techniques de Chromatographie Planaire Multiséquentielle pour la séparation.

1. Migration Double Unidimensionnelle:

Phase éluante 1: toluène - acétate d'éthyle - acide formique (TEF) (60: 30: 10) pour la (F) et la (Z), à front perdu, puis séchage et développement dans le même sens dans la phase éluante 2.

Phase éluante 2: butanol - acide acétique -eau (80: 20: 20) pour la (F) ou chloroforme - éthanol (95: 5) pour la (Z).

2. Migration Double Antidirectionnelle: pour le (D)

Les dépôts sont effectués à mi-hauteur de la plaque, puis soumis à un développement dans la phase éluante 1 à front perdu. Après séchage et coupure à 2cm au-dessus du Rf de la toxine, la plaque est retournée (180°) et placée dans le mélange suivant: $CHCl_3$ - MeOH (90: 10) pour la séparation finale.

La quantification fut effectuée par spectrofluorodensitométrie (Shimadzu CS 930) après avoir déterminé la longueur d'onde maximale (λ max) d'excitation en fluorescence sans dérivation postchromatographique pour la (F) ou après dérivation pour le (D) par pulvérisation de chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) à 20% suivi d'un chauffage à 110° pendant 10 mn (Kamimura et al., 1981). Pour la (Z), la λ max d'absorption après application de benzidine (Malaiyandi et al., 1976) par pulvérisation fut déterminée.

Seuls les (TD) furent détectés par la voie biologique: 5μl d'extrait purifié et concentré (E_2 - TD - e) furent déposés sur la peau d'une jeune ratte (100 - 150g). Les éventuelles lésions basées sur l'action irritante et nécrosante des trichothécènes sont observées au 3ème et 5ème jour (Le Bars & Le Bars, 1991).

RÉSULTATS

1. Méthode analytique

L'ensemble des techniques retenues (mélange de solvants, séquences de développement, ...) ont permis la séparation des différentes mycotoxines recherchées; cette dernière fut validée, pour chaque plaque, par la méthode des ajouts. Les performances quantitatives de ces techniques sont résumées dans le tableau 1.

2. Distribution du potentiel toxinogène

La fusarochromanone ne fut détectée dans aucune des cultures. En ce qui concerne les autres mycotoxines, la fréquence des souches productrices est rapportée dans le tableau 2.

Aucune des mycotoxines envisagées dans cette étude n'a pu être mise en évidence dans les 2 souches sélectionnées pour la lutte biologique.

En ce qui concerne les autres souches, isolées de différentes denrées, la zéaralénone, le déoxynivalénol et les autres trichothécènes (TD) ont été détectés. Certaines souches peuvent élaborer simultanément plusieurs toxines. Pour une toxine donnée, l'intensité de la production est très variable en fonction des souches. La distribution du potentiel toxinogène, pour la zéaralénone et le déoxynivalénol, est représentée dans les figures 1 et 2 après constitution de classes selon une échelle logarithmique (Le Bars & Le Bars, 1991). Les productions

	fusarochromanone	déoxynivalénol	zéaralénone
longueur d'onde maximale . d'excitation pour la fluorescence (λ max. fluorescence) . d'absorption (λ max. absorption)	385 nm	330 nm après pulvérisaton d'$AlCl_3$ 20%	500 nm après pulvérisaton de benzidine
seuil de détection (detection limit)	0,1 ng	10 ng	25 ng
zone de linéarité de la réponse (relation quantité-aire) (response linearity)	0,1 à 6 ng	10 à 190 ng	25 à 500 ng
taux de recouvrement après contamination volontaire (recovery rate)	90 à 95%	83 à 91%	76 à 112%
limite de quantification (mg/kg = ppm) (quantification limit)	0,005	0,25	0,075

Tableau I : Performances des techniques analytiques utilisées pour le dosage des mycotoxines en Chromatographie Planaire Instrumentalisée.

Table 1: Performances of the analytical methods used for the mycotoxins quantification by Instrumental Thin Layer Chromatography.

maximales furent respectivement 14500 et 100μg/g pour la zéaralénone et le déoxynivalénol.

Les extraits de 10 souches présentèrent une irritation significative sur la peau des animaux, mais sans provoquer une nécrose nette et durable; c'est à dire que les concentrations estimées en unités dermonécrosantes (Le Bars & Le Bars, 1991) correspondaient à des concentrations inférieures à 0,2 ppm en équivalent dermonécrosant de la toxine T2.

DISCUSSION

La fusarochromanone provoque des malformations osseuses, la dyschondroplasie tibiale (Lee et al., 1985), et est fortement suspectée de pouvoir tératogène. Le test de toxinogénèse mis en oeuvre a été validé grâce à la culture d'une souche productrice(1). La technique de dosage mise au point présente un

(1) Aimablement fourni par MIROCHA C.J., Université de St Paul, Minnesota, U.S.A.

Espèces	Z	D	TD	Z+D	Z+D+TD
F. graminearum	(26/31) 84	(4/31) 13	(3/31) 9,7	(2/31) 6,5	(2/31) 6,5
F. culmorum	(14/22) 63,6	(4/22) 18	(6/22) 27	(1/22) 4,5	(2/22) 9
Autres F. roseum	(3/20) 15	(1/20) 5	(1/20) 5	(0/20) ND	(0/20) ND
Ensemble	(43/73) 59	(9/73) 12,3	(10/73) 13,7	(3/73) 4,1	(4/73) 5,5

Tableau 2 : Fréquence de souches de *Fusarium* élaborant une ou plusieurs mycotoxines (Z = zéaralénone; D = déoxynivalénol; TD = trichothécènes dermonécrosants). () : nombre de souches productrices sur le nombre de souches examinées.

Table 2: Frequency of *Fusarium* strains producing one or several mycotoxins (Z = zearalenone; D = deoxynivalenol; TD = skin-necrotizing trichothecenes). () : number of the toxinogenic strains on the number of studied strains.

taux de recouvrement supérieur et un seuil de détection équivalent à ceux rapportés par Krogh et al. en 1989; quant à la limite de quantification, elle est comparable à celle obtenue par Yu & Chu en 1991 lors du dosage par immunochromatographie. Sous réserve de la représentativité des souches examinées, il s'avère que cette toxine ne devrait pas constituer un problème aigu en France. Ces observations corroborent les travaux de Wu et al. (1990); en effet, sur 62 souches de *Fusarium* représentant 9 espèces de différentes régions du monde, seulement 3 isolats de *F. equiseti* se sont avérés producteurs de fusarochromanone.

La zéaralénone provoque chez les animaux et principalement le porc, une perturbation de la fonction de reproduction. La technique analytique mise en oeuvre permet d'atteindre une limite de quantification équivalente à celle recommandée l'AFNOR et l'ISO (International Standard Organization) (Anonyme, 1986), tout en s'affranchissant de l'emploi de la Chromatographie Bidimensionnelle et permettant ainsi la séparation et le dosage de plusieurs extraits sur la même plaque. La fréquence des souches toxinogènes pour la zéaralénone dans les espèces *F. graminearum* et *F. culmorum*, les plus fréquemment isolées à partir de céréales est importante (59%), elle est équivalente à celle résultant d'une étude similaire (60%) effectuée en 1978 (Le Bars, 1982). On peut considérer que le tiers des souches, ayant produit plus de 250 µg g dans ces conditions expérimentales, peut conduire à une contamination naturelle de céréales si les conditions de conservation permettent leur développement.

Le déoxynivalénol, prénommé antérieurement "facteur de refus" ou "vomitoxine" perturbe principalement la fonction digestive. Les modifications apportées (traitement de l'extrait après élution) à la technique de dosage du déoxynivalénol (Eppley et al., 1986; Romer, 1986) ont permis une plus grande

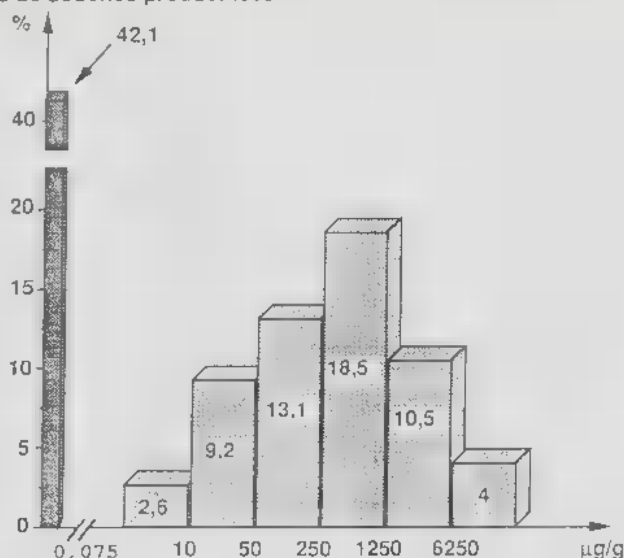


Figure 1 : Répartition du potentiel toxinogène des souches de *Fusarium* pour la zéaralénone.

Figure 1: Toxinogenic strength distribution of *Fusarium* strains for zearalenone.

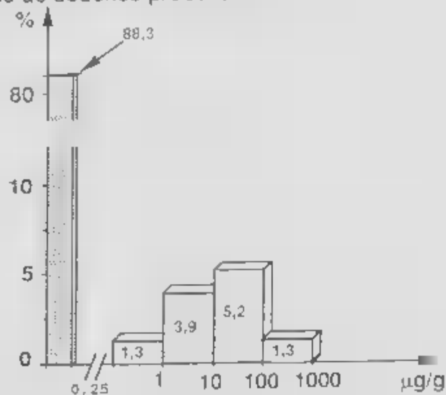


Figure 2 : Répartition du potentiel toxinogène des souches de *Fusarium* pour le déoxynivalénol.

Figure 1: Toxigenic strength distribution of *Fusarium* strains for deoxynivalenol.

souplesse d'utilisation tout en conservant un taux de recouvrement et une limite de quantification équivalents. Le dosage du déoxynivalénol et de la zéaralénone à partir d'un même extrait s'inscrit dans une démarche de multidétection, d'autant plus que ces 2 mycotoxines sont souvent associées en tant que contaminant naturel (Jemmali et al., 1978; Mirocha et al., 1976; Tanaka et al., 1988). Parmi

les souches productrices, seulement 6,5‰ peuvent être considérées comme présentant un risque réel. Cette fréquence est analogue à celle rapportée par Ramakrishna et al. (1989) dans leur étude sur 322 souches isolées de blé en Inde.

La détection et la quantification des trichothécènes par des méthodes physico-chimiques demeurant laborieuses (Gilbert, 1984; Scott, 1982; Scott & Kanhere, 1986), une estimation semi-quantitative par le test de l'irritation cutanée est validée par la relation dose-réponse entre la quantité de trichothécènes et l'intensité des lésions sur la peau de l'animal (Chung et al., 1974; Fairhurst et al., 1987; Hayes & Schiefer, 1979). En conséquence, cette technique biologique permet de répondre à l'objectif fixé. Malgré une fréquence non négligeable (14‰) de souches productrices d'une ou plusieurs molécules de cette famille, le risque de contamination des denrées à l'état naturel doit être très limité compte tenu des faibles concentrations obtenues dans des conditions optimales de toxinogénèse.

Les principales toxines recherchées peuvent être élaborées par des souches appartenant à différentes espèces, ce qui est en accord avec les travaux rapportés par Thrane (1989), il en résulte que la relation espèce-toxine est, comme dans le genre *Penicillium*, moins étroite que celle entre l'*Aspergillus flavus* et les aflatoxines par exemple. En conséquence, la vérification de la non-toxinogénicité d'une souche de *Fusarium* doit prendre en compte les principales fusariotoxines, indépendamment de l'espèce.

Il apparaît logique que, pour des raisons de qualité et de sécurité alimentaires, des souches fongiques mycotoxinogènes ne soient pas dispersées volontairement dans l'environnement. Mais cette disposition n'est pas prévue dans le classement des microorganismes proposé par l'European Federation of Biotechnology (Anonyme, 1985); cette liste provisoire et évolutive présente seulement "les espèces microbienne communément reconnues comme pathogènes pour l'Homme" (AFNOR, 1990).

D'autre part, ce type d'utilisation (lutte biologique) de microorganismes ne rentre pas non plus dans la classification de l'US - FDA concernant les biotechnologies et les substances "généralement reconnues comme saines" (GRAS: "generally recognized as safe") (Mc Namara, 1987; Gibbs & Kahan, 1986).

En conséquence, il devient urgent que les experts toxicologues s'accordent sur une stratégie, une méthodologie et des dispositions raisonnables, spécifiques à l'utilisation de souches fongiques pour la lutte biologique. En effet, autant est-il logique de ne pas disperser dans l'environnement des souches fortement productrices de mycotoxines connues, autant une trop grande prudence condamnerait-elle toute innovation constituant une alternative à l'utilisation de pesticides de synthèse, fortement combattue par ailleurs.

RÉFÉRENCES

AFNOR, 1990 - Liste des espèces microbiennes communément reconnues comme pathogènes pour l'Homme. Norme X 42-040, 10 p.

ALABOUVETTE C., de la BROISE D., LEMANCEAU P., COUTEAUDIER Y. et LOUVET J., 1987 - Utilisation de souches non pathogènes de *Fusarium* pour lutter contre les fusarioses: situation actuelle dans la pratique. Bulletin OEPP/EPPO, Bulletin 17: 665-674.

Anonyme, 1985 - European Federation of Biotechnologies - Safe biotechnology, general considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 21: 1-6.

Anonyme, 1986 - AFNOR: Aliments des animaux. Dosage de la zéaralénone. NF V 18-201. 6p.

BOOTH C., 1984 - The *Fusarium* problem: historical, economic and taxonomic aspects. *In:* M.O. MOSS & J.E. SMITH, *The Applied Mycology of Fusarium*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press: 1-13.

CHELKOWSKY J., 1989 - *Fusarium. Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ. 492 p.

CHUNG C.W., TRUCKSESS M.W., GILES A.L. and FRIEDMAN L., 1974 - Rabbit skin for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 57: 1121-1127.

Di MENNA M.E., LAUREN D.R., POOLE P.R., MORTIMER P.H., HILL R.A. and AGNEW M.P., 1987 - Zearalenone in New-Zealand pasture herbage and the mycotoxin-producing potential of *Fusarium* species from pasture. *New Zealand J. Agric. Res.* 30: 499-504.

EPPLEY R.M., TRUCKSESS M.W., NESHEIM S., THORPE C.W. and POHLAND A.E., 1986 - Thin layer chromatographic method for determination of deoxynivalenol in wheat: collaborative study. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 69: 37-40.

EUGENIO P.C., CHRISTENSEN C.M. and MIROCHA C.J., 1970 - Factors affecting producing of the mycotoxin F-2 by *Fusarium roseum*. *Phytopathology* 60: 1055-1057.

FAIRHURST S., MAXWELL S.A., SCAWIN J.W. and SWANSTON D.W., 1987 - Skin effect of trichotecens and their amelioration by decontamination. *Toxicology* 46: 307-319.

GAREIS M., BAUER J., ENDERS C. and GEDEK B., 1989 - Contamination of cereals and feeds with *Fusarium* mycotoxins in European countries. *In:* J. CHELKOWSKI, *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity*. Amsterdam, Elsevier Sc. Publ.: 441-472.

GIBBS J.N. and KAHAN J.S., 1986 - Biotechnology and the food industry: leaping the regulatory hurdles. *Biotechnology* 4: 199-205.

GILBERT J., 1984 - The detection and analysis of *Fusarium* mycotoxins. *In:* M.O. MOSS & J.E. SMITH, *The Applied Mycology of Fusarium*. Cambridge, U.K., Cambridge University Press: 175-193.

GREENHALGH R., NEISH G.A. and MILLER J.D., 1983 - Deoxynivalenol, acetyl deoxynivalenol and zearalenone formation by Canadian isolate of *Fusarium graminearum* on solid subtrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 625-629.

GROVE J.F., 1988 - Non-macrocyclic trichothecenes. *Nat. Prod. Rep.* 5: 187-209.

HAYES M.A. and SCHIEFER H.B., 1979 - Quantitative and morphological aspects of cutaneous irritation by trichothecenes mycotoxins. *Food Cosmet. Toxicol.* 17: 611-621.

JEMMALI M., UENO Y., ISHII K., FRAYSSINET C. and ETIENNE M., 1978 - Natural occurrence of trichothecenes (nivalenol, deoxynivalenol, T-2) and zearalenone in corn. *Experientia* 34: 1333.

KAMIMURA H., NISHIJIMA M., YASUDA K., SAITO K., IBE A., NAGAYAMA T., USHIYAMA H. and NAOI Y., 1981 - Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereal grains, and foodstuffs. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 64: 1067-1073.

KROGH P., CHRISTENSEN D.H., HALD B., HARLOU B., LARSEN C., PEDERSEN E.J. and THRANE U., 1989 - Natural occurrence of the mycotoxin fusarochromanone, a metabolite of *Fusarium equiseti*, in cereal feed associated with tibial dyschondroplasia. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 3184-3188.

LE BARS J. and LE BARS P., 1991 - Toxinogenesis and development conditions of *Stachybotrys atra* in France. *Acta Vet. Scand.* 87: 349-351.

LE BARS J., 1982 - Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grains-microorganismes. *In:* J.L. MULTON, *Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés.* Paris, Lavoisier, Techniques et documentation 1: 376-393.

LEE Y.W., MIROCHA C.J., SHROEDER D.J. and WALSER M.M., 1985 - TDP - 1, a toxic component causing tibial dyschondroplasia in broiler chickens, and trichothecenes from *Fusarium roseum "Graminearum". Appl. Environ. Microbiol.* 50: 102-107.

MALAIYANDI M., BARETTE J.P. and WAVROCK P.L., 1976 - Bis diazotized benzidine as a spray reagent for detecting zearalenone on thin-layer chromoplates. *J. Assoc. Analytical Chem.* 59: 959-962.

MARASAS W.F.O., NELSON P.E., TOUSSOUN T.A., 1984 - *Toxigenic Fusarium species. Identity and Mycotoxicology.* The Pennsylvania State University Press.

Mc NAMARA S.H., 1987 - FDA regulation of food substances produced by new techniques of biotechnology. *Food Drug Law J.* 42: 50-64.

MIROCHA C.J., CHRISTENSEN C.M. and NELSON G.H., 1971 - F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium. In:* S. KADIS, A. CIEGLER & S.J. AJL, *Microbiol. Toxins.* New York, Academic Press, VII: 107-138.

MIROCHA C.J., PATHRE S.V., SCHAUERHAMER B. and CHRISTENSEN C.M., 1976 - Natural occurrence of *Fusarium* toxins in feedstuff. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 553-556.

NELSON P.E., TOUSSOUN T.A. and COOK R.J., 1981 - *Fusarium. Diseases, Biology, and Taxonomy.* The Pennsylvania State University Press: 3-221.

PATHRE S.V. and MIROCHA C.J., 1979 - Natural occurrence and potential hazard. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 56: 820-823.

PATHRE S.V., GLEASON W.B., LEE Y.W. and MIROCHA C.J., 1986 - The structure of fusarochromanone: new mycotoxin from *Fusarium roseum. "Graminearum". Canad. J. Chem.* 64: 1308-1311.

RAMAKRISHNA Y., BHATAND R.V. and RAVINDRANATH V., 1989 - Production of deoxynivalenol by *Fusarium* isolates from samples of wheat associated with a human mycotoxicosis outbreak and from sorghum cultivars. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 2619-2620.

ROMER T.R., 1986 - Use of small charcoal / alumina cleanup colums in determination of trichothecenes mycotoxins in foods and feeds. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 69: 699-703.

SCOTT P.M. and KANHERE S.R., 1986 - Comparison of column phases for separation of derivatized trichothecenes by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr.* 368: 374-380.

SCOTT P.M., 1982 - Assessment of quantitative methods for determination of trichothecenes in grains and grain products. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 65: 876-883.

SNYDER A.P., 1986 - Qualitative, quantitative and technological aspects of the trichothecene mycotoxins. *J. Food Prot.* 49: 544-569.

STEYN P.S., 1980 - *The Biosynthesis of Mycotoxins, a Study in Secondary Metabolism.* New York, Academic Press, 432 p.

TANAKA T., HASEGAWA A., YAMAMOTO S., LEE U.S., SUGIURA Y. and UENO Y., 1988. - Worldwide contamination of cereals by the *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone. 1. Survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.* 36: 979-983.

THRANE U., 1989 - *Fusarium* species and their specific profiles of secondary metabolites. *In:* J. CHELKOWSKI, *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity.* Amsterdam, Elsevier Sci. Publ.: 199-225.

TRUCKSESS M.W., NESHEIM S. and EPPLEY R.M., 1984 - Thin layer chromatographic determination of deoxynivalenol in wheat and corn. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 67: 40-43.

UENO Y., 1983 - *Trichothecenes. Chemical, Biological and Toxicological Aspects.* Amsterdam, Elsevier Sci. Publ., 4: 313 p.

VESONDER R.F. and GOLINSKI P., 1989 - Metabolites of *Fusarium. In:* J. CHELKOWSKI, *Fusarium, Mycotoxins, Taxonomy and Pathogenicity.* Amsterdam, Elsevier Sci. Publ.: 13-31.

WU W., NELSON P.E., COOK M.E. and SMALLEY E.B., 1990 - Fusarochromanone production by *Fusarium* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2989-2993.

XIE W., MIROCHA C.J., PAWLOSKY R.J., WEN Y. and XU X., 1989 - Biosynthesis of fusarochromanone and its monoacetyl derivative by *Fusarium equiseti. Appl. Environ. Microbiol.* 55: 794-797.

YU J. and CHU F.S., 1991 - Immunochromatography of fusarochromanone mycotoxins. *J. Assoc. Off. Analytical Chem.* 74: 655-660.

Source : MNHN, Paris

Cryptogamie, Mycol. 1992, 13 (3) : 171-179

STRATÉGIES ÉCOLOGIQUES ET BIOLOGIQUES DES MORILLES

François BUSCOT

Institut für Bodenbiologie, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft, Bundesallee 50, D 3300 Braunschweig (RFA)

RÉSUMÉ - Les morilles possèdent deux stratégies écologiques. Elles s'implantent comme organismes pionniers éphémères et saprophytes sur des sols recemment bouleversés. Dans des écosystèmes stables elles s'établissent plus durablement et, grâce à une double association saprophytique et ectomycorrhizienne avec des plantes supérieures, fructifient durant plusieurs années de suite à la même place. Les spores produites lors de cette phase pérenne permettent la colonisation éphémère des sites perturbés. Les donnes biologiques disponibles suggèrent qu'au cours de sa phase pérenne le champignon augmenterait son potentiel génétique en formant un mycélium hétérocaryotique.

ABSTRACT - Morels have two ecological strategies. They can establish ephemerally as pioneers and saprophytes on recently disturbed soils. In stable ecosystems, they establish and fructificate durably, as they contract a double, saprophytical and ectomycorrhizal association with plants. The spores produced every year within this latter strategy allow the ephemeral colonization of disturbed sites by the fungus. Actual biological informations suggest that morels reinforce their genetical potential during the perenous phase by forming a heterokaryotic mycelium.

MOTS CLÉS : *Morchella*, adaptations écologiques, mycorhizes, saprophytisme, cycle biologique.

La fructification des morilles est observée dans les conditions les plus diverses (Fourré, 1985). Celles-ci peuvent cependant être regroupées en deux catégories, qui relèvent de deux stratégies écologiques distinctes du champignon. En faisant la synthèse des faits connus cet article montre l'interdépendance qui existe entre ces deux stratégies en zone tempérée, et dans quelle mesure les caractéristiques biologiques du champignon permettent cette remarquable plasticité écologique.

Stratégie écologique "pionnière"

Cette première stratégie aboutit à des poussées parfois abondantes mais toujours éphémères sur des sols récemment bouleversés par exemple à la suite de feux de forêts (Kaul, 1975; Turnau, 1984), d'éruptions volcaniques (Carpenter et al., 1987) ou de l'emploi de pesticides (Turnau, 1987). Les poussées consécutives à l'apport d'un substrat exogène plus ou moins artificiel, papier, colle, chiffon, marc de pomme etc., s'inscrivent également dans cette stratégie (Fourré, 1985).

Le développement de fructifications dans de telles conditions n'a pas été étudié *in situ.* Il semble cependant qu'il résulte d'un mode de nutrition exclusivement saprophytique. Cette hypothèse, corroborée par la capacité bien connue du mycélium à une croissance saprophytique (Fron, 1905; Brock, 1951; William et al., 1956; Gilbert, 1960; Litchfield, 1967; Impens, 1972; Kaul, 1977; Sekharam et al., 1978; Kone, 1979), a été confirmée expérimentalement par l'obtention de fructifications dans des conditions saprophytiques et par ailleurs semblables à celles qui, dans la nature, permettent des fructifications "pionnières" (Molliard, 1905; Costantin, 1936; Ower, 1982; Ower et al., 1986). Ces derniers travaux ont en outre révélé que les ascocarpes se développent alors aux dépens de sclérotes, qui, chez les morilles, s'édifient secondairement, lorsqu'un mycélium primaire a épuisé les ressources du milieu en azote (Mayr, 1982). Sur des bases morphologiques, cet auteur a distingué deux types de sclérotes correspondant respectivement à des ascocarpes abortifs et à une forme d'accumulation de réserves. Cette distinction a été confirmée par Buscot (1987, 1992a), qui, en raison de leurs conditions respectives de formation, a nommé ces deux types de sclérotes "Early, Incrusting Sclerotia" (EIS) et "Late, Isolated, Sclerotia" (LIS). Les propriétés écophysiologiques respectives de ces sclérotes confirment également que les EIS sont assimilables à des primordium d'ascocarpes, les LIS étant une forme d'accumulation de réserve et de résistance au froid (Buscot, 1992a).

Stratégie écologique pérenne

La seconde stratégie écologique des morilles aboutit à leur fructification dans des écosystèmes stables. La production d'ascocarpes est alors peu abondante, mais une placette donnée produit pendant plusieurs années (Buscot, 1987). Des travaux anciens ont révélé que le champignon est alors associé à des rhizomes ou des racines de plantes supérieures (Robert, 1865; Roze, 1883). Des observations récentes ont confirmé qu'en milieu forestier les ascocarpes sont reliés par des cordons mycéliens à des agrégats mycéliens souterrains, formés autour de racines conductrices (Buscot & Roux, 1987). L'étude écophysiologique *in situ* de ces systèmes a montré que l'association rhizofongique est contractée avant la fructification vernale, les ascocarpes se développant en utilisant les réserves accumulées dans les agrégats mycéliens souterrains (Buscot, 1989). Parallèlement à leur contribution au développement de la fructification, ces agrégats produisent également au printemps un front mycélien qui s'associe à de jeunes racines déjà mycorhizées par d'autres espèces fongiques, et avec lesquelles il forme lui-même des ectomycorhizes secondaires (Buscot & Kottke, 1990; Buscot, 1991).

Comme pour le cas de la stratégie "pionnière", l'interpretation exhaustive de cette seconde stratégie écologique repose partiellement sur des résultats expérimentaux. Des analyses comparatives de mycosporines, molécules du métabolisme secondaire utilisables comme marqueurs de différenciations préreproductrices et reproductrices, ont montré que les agrégats mycéliens souterrains formés autour des racines conductrices sont la forme naturelle des LIS (Buscot & Bernillon, 1991). Ces agrégats sont édifiés en été et constituent la seule forme du champignon capable de survivre à l'hiver (Buscot, 1989, 1992a). Ils génèrent au printemps à la fois les ascocarpes et l'association mycorhizienne qui constitue le point de départ d'un nouveau cycle végétatif. Des expérimentations en culture ont confirmé que le mycélium de morille est capable de contracter deux types d'associations avec des racines d'épicea, de pin ou de chêne (Buscot, 1992b). D'une part et à condition d'être associé à une bactérie du genre *Bacillus* qui peut être isolée à partir des ascospores, le mycélium de morille peut former

des ectomycorhizes. D'autre part, le champignon peut former des LIS autour de la partie âgée et conductrice des racines. Cette seconde association est favorisée lorsque le mycélium a été précultivé sur un milieu pauvre et lorsque la plante a été préalablement mycorhizée par un champignon tiers. Elle est de nature saprotrophique. Le champignon ne pénètre en effet que les assises cellulaires secondaires et mortes des racines âgées. Par ailleurs les LIS de morille produisent un lait (Buscot, 1992a) qui contient des exoenzymes lignolytiques (Buscot non publié), et ils pourraient ainsi posséder la capacité de mobiliser le carbone à partir de molécules complexes. Une telle aptitude a récemment été caractérisée chez des champignons ectomycorhiziens facultatifs (Haselwander et al., 1990).

Rapport entre les deux stratégies

La morille possède donc deux stratégies écologiques distinctes. L'une, dite pionnière, dans laquelle le champignon se comporte en organisme saprophyte éphémère, capable de s'implanter transitoirement sur un milieu récemment modifié, l'autre, dite pérenne, dans laquelle le champignon, contractant une double association avec les parties âgées et jeunes du système racinaire d'arbres, peut se maintenir durablement dans des écosystèmes stables, tout en produisant régulièrement quelques ascocarpes selon un cycle biologique bisannuel (Fig. 1). Plusieurs faits indiquent que sous les climats tempérés, ces deux stratégies ne sont pas indépendantes.

Les morilles ne possèdent pas les caractéristiques biologiques propres aux organismes typiquement pionniers. En particulier, elles ne possèdent pas de propagules capables de latence dans le sol entre deux poussées pionnières. Non seulement les ascospores de morille germent dès qu'elles entrent en contact avec un substrat humide (Buscot, 1987), mais elles sont incapables de germer dans le sol lorsqu'on les y inocule artificiellement en dehors de la période printanière de leur dispersion naturelle (Schmidt, 1983). En outre, le mycélium de morille n'est pas capable de résister au gel (Buscot, 1992a). La colonisation parfois massive de sols récemment bouleversés devrait donc faire suite à un apport exogène de spores postérieur au bouleversement, ces spores germant au printemps à la première pluie qui suit leur production. Cette hypothèse est corroborée par le fait qu'une étude attentive des rapports mentionnant des fructifications pionnières montre que celles-ci n'interviennent qu'après qu'au moins une saison de végétation ait fait suite au bouleversement du sol (Turnau, 1984; Carpenter et al., 1987). Par ailleurs la sporulation des ascocarpes de morille est suffisamment abondante (Falck, 1920) pour que les ascocarpes développés selon la stratégie pérenne soient aptes à assurer cet apport exogène.

D'une manière similaire, et encore qu'aucun auteur n'ait entrepris d'investigations dans ce sens, il apparaît probable qu'au cours d'un épisode pionnier, un mycélium venant à s'associer à un appareil racinaire puisse poursuivre son développement selon la stratégie pérenne. La figure 1 résume les deux stratégies écologiques et leur imbrication.

Ce schéma global suppose que, dans la stratégie pionnière, le cycle biologique du champignon soit également bisannuel. Dans les régions tempérées, l'initiation et le développement des LIS sont de fait favorisés par des températures élevées, qui correspondent à celles mesurées dans le sol en été (Buscot, 1987, 1992a). La maturation des ascocarpes est elle-même corrélée au réchauffement printanier (Delmas & Bunel, 1975; Buscot, 1989). Néanmoins, des expérimentations ont montré que la fructification peut également être déclenchée par des facteurs autres que thermiques, tel qu'un lessivage (Ower,

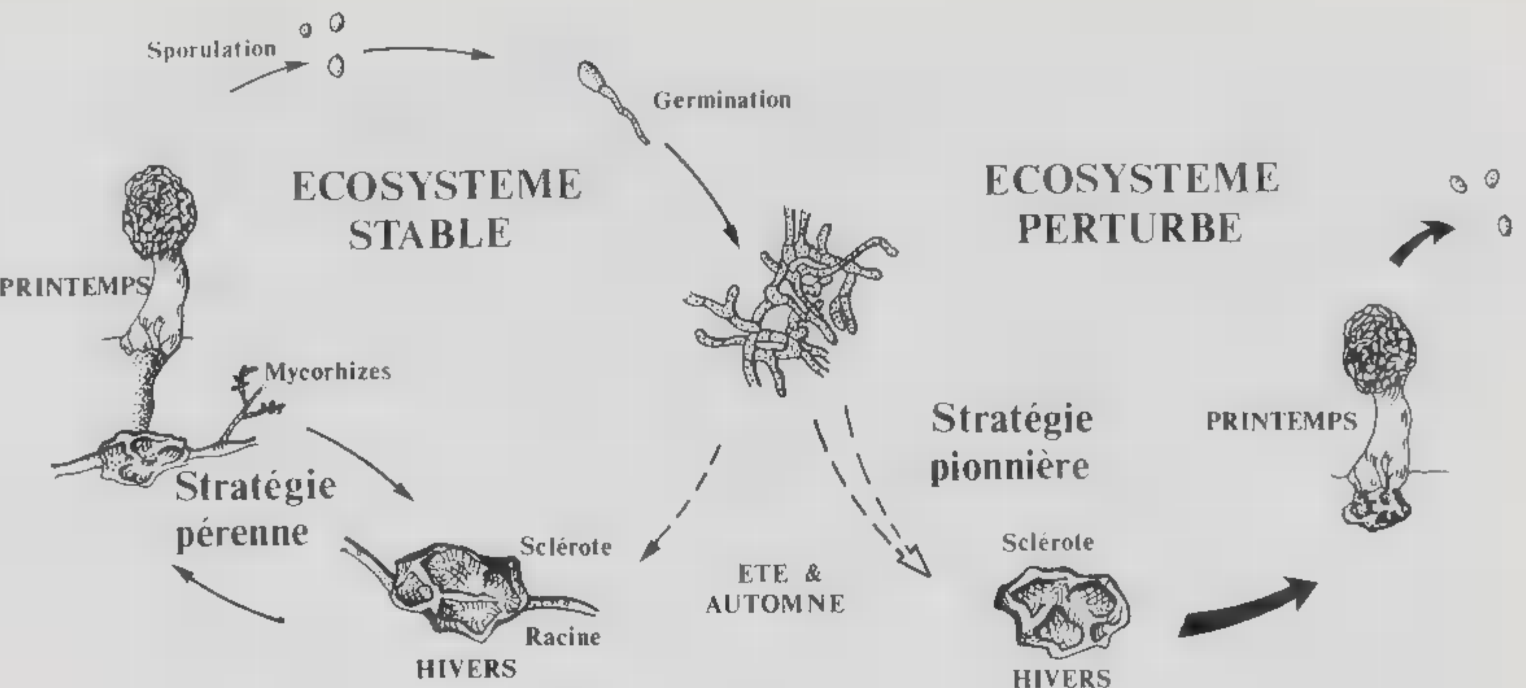


Fig. 1: Schéma récapitulatif des deux stratégies écologiques de la morille et de leur imbrication. Les flèches en pointillé marquent la phase du cycle biologique, durant laquelle le champignon, s'implantant dans un écosystème, opte pour une des deux stratégies. L'épaississement des flèches de la stratégie pionnière symbolise l'abondance des sclérotes, fructifications et spores produites dans cette stratégie.

Fig. 1: The two ecological strategies of morels in a recapitulative diagram.

1982; Ower et al., 1986). Cette possibilité explique l'extension du genre en dehors des zones marquées par un hiver froid et un réchauffement vernal (Heim, 1966), ou également les rares cas de fructifications automnales (Berthet, 1983). Le schéma proposé ne rend pas compte de ces derniers cas de figures. Ceux-ci ont été très peu étudiés, néanmoins, les observations effectuées en milieu tropical indiquent que les morilles y sont associées à des végétaux supérieurs (Heim, 1966; Lakhanpal et al., 1991).

Stratégies biologiques.

Dans un article de revue récent, Agerer (1991) fait observer que par coenocytie, dicaryotie voire polyploïdie de nombreux champignons mycorhiziens renforcent leur potentiel génétique lors de leur phase symbiotique. Chez le basidiomycète ectomycorhizien *Laccaria fraterna* l'adaptation à une écologie pionnière est marquée par l'existence de mitoses post-méiotiques surnuméraires et par la formation des dicaryons au sein même des basides (Tommerup et al., 1991). Ce renforcement précoce du potentiel génétique n'est pas observé chez les autres espèces du genre, qui ne montrent pas la même plasticité écologique. Les travaux de Berthet (1964) ont montré que l'évolution des discomycètes a été marquée par l'apparition puis l'amplification de la coenocytie, qui a atteint son développement maximal chez les morchellacées. Chez *Morchella*, les spores sont en effet plurinucléées avant même l'individualisation de leur paroi dans l'asque, et les articles mycéliens comprennent une quarantaine de noyaux (Buscot, 1987). Ce renforcement du potentiel génétique ne compense toutefois que partiellement le fait que, comme celui des autres ascomycètes, le mycélium de morille soit classiquement considéré comme haplonte durant la presque totalité du cycle biologique (Chadefaud, 1960). Des résultats récents permettent cependant de discuter le bien-fondé de cette considération classique dans le cas des morilles. En effet, le mycélium de morille possède la capacité de former des anastomoses végétatives permettant des échanges de noyaux y compris entre souches différentes (Bresinsky et al., 1972). Hervey et al. (1978), réalisant des confrontations binaires entre souches monosporales, ont observé la formation de barrages de mycélium aérien lorsque les souches confrontées ne sont pas issues d'une même ascospore. Volk & Leonard (1989) ont baptisé ces barrages "mycelial meld", et, à l'aide de souches mutantes, ont formellement démontré la nature hétérocaryotique de leur mycélium, dont le potentiel de croissance est par ailleurs limité sur le milieu utilisé par les auteurs. Ceux-ci ont de surcroît interprété l'appariement d'un grand nombre de noyaux au sein des hyphes terminales des "mycelial melds" comme la marque de leur état dicaryotique (Volk & Leonard, 1990). Cependant, des figures rigoureusement identiques sont observées dans les hyphes terminales de souches haploïdes en croissance (fig. 2), et la variabilité de la distance entre noyaux appariés suggère que les figures similaires observées par Volk & Leonard soient en fait des figures post-méiotiques, nécessairement nombreuses dans les articles apicaux d'un mycélium coenocytique en croissance. D'ailleurs, chez la morille, la formation effective des dicaryons est connue de longue date pour ne s'opérer que dans l'hypothécium à la fin de l'élongation de l'ascocarpe, ces dicaryons s'isolant immédiatement par septation et ne subissant que quelques mitoses conjugées avant leur fusion dans les cellules proascales (Greiss, 1940). Si la capacité du champignon à former un mycélium hétérocaryotique en culture est hors de doute, l'interprétation de la formation précoce de dicaryons dans un tel mycélium est donc probablement erronée.

Buscot (1987, 1992a) a montré que, cultivées sur un milieu riche en azote, des souches polysporales de morille ont tendance à s'isoler les unes des au-

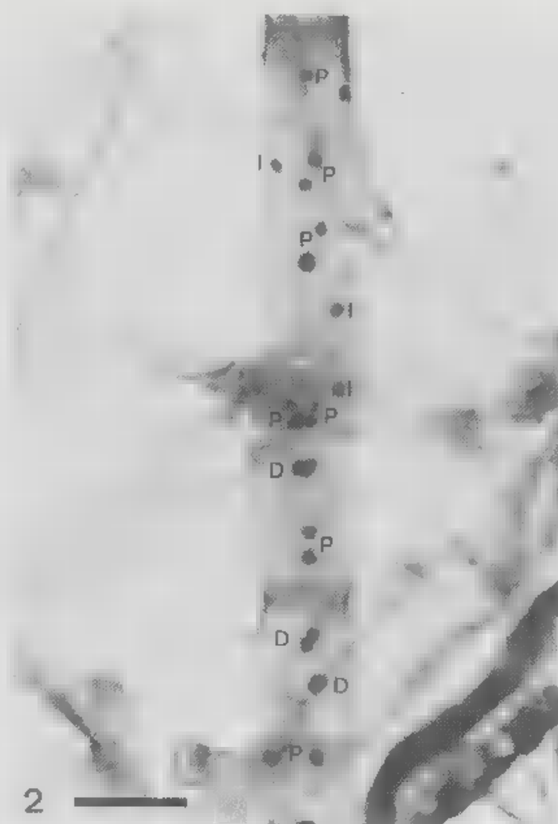


Fig. 2: Répartition des noyaux dans les articles apicaux d'un mycélium issu d'une monospore de *Morchella esculenta*. Les noyaux sont isolés (I), en cours de division (D) ou encore appariés à la suite d'une division (P). Dans ce dernier cas la distance qui les sépare est variable. Des figures rigoureusement semblables sont observées dans des hyphes apicales de colonies hétérocaryotiques (coloration, Giemsa; échelle, 5 μm).

Fig. 2: Nuclei in apical cells of mycelium derived from one spore of *Morchella esculenta*.

tres et à édifier des "mycelial melds" à leur frontière. En revanche, sur un milieu pauvre en azote, elles forment un mycélium caractérisé par une parfaite homogénéité physiologique et de développement, et dont les aptitudes morphogènes renforcées semblent indiquer la nature hétérocaryotique. Ainsi, suivant le contexte trophique, différentes souches monosporales de morilles se séparent en ne formant un mycélium hétérocaryotique à potentiel de croissance réduit qu'au niveau de leurs zones d'interaction, ou fusionnent au contraire en un mycélium caractérisé par un fort potentiel de développement et de différenciation, et qui pourrait être hétérocaryotique.

Ce dernier résultat est susceptible d'éclairer d'un point de vue biologique le passage entre les deux stratégies écologiques de la morille. Le mycélium de morille est connu pour mal résister à la compétition avec d'autres champignons

ou bactéries (Buscot, 1987). Ceci explique en partie son développement abondant sur des sols bouleversés, dans lesquels outre un pH favorable il dispose de reserves facilement mobilisables (Kaul, 1975) dans des conditions de concurrence réduite (Petersen, 1985). Les résultats de culture suggèrent que dans un tel contexte, le champignon n'aurait que marginalement recours à la formation de myccliums hétérocaryotiques, les phénomènes de rejet génétique après fusion limitée étant connus chez d'autres espèces pour être exacerbés dans un contexte trophique riche (Rayner, 1991). Par contre, dans les conditions de son développement pérenne dans des écosystèmes plus fermés et caractérisés par une pression de concurrence accrue, le champignon accède plus difficilement aux éléments nutritifs. Les résultats de culture suggèrent qu'il produirait alors un mycélium hétérocaryotique vigoureux, le potentiel génétique renforcé de ce mycélium permettant au champignon de contracter des relations équilibrées avec les organismes, racines secondaires, bactéries et mycorhizes primaires auxquels il s'associe avant de former lui-même des mycorhizes.

La confirmation de ces dernières hypothèses nécessite un examen des interactions mycéliennes au niveau moléculaire. Des travaux dans ce sens sont en cours.

Remerciements: Nous dédions respectueusement cet article à Messieurs les professeurs N. Arpin, A. Bellemère, J. Dexheimer, G. Manachère, F. Oberwinkler et J. Roux, qui nous ont encouragé et aidé tout au long de nos investigations sur la morille. Nous tenons également à remercier la Fondation de France et la Fondation Alexander von Humboldt pour leur soutien financier.

RÉFÉRENCES

AGERER R., 1991 - Characterization of ectomycorrhiza. *Meth. Microbiol.* 23: 26-73.

BERTHET P., 1964 - Essais biotaxonomique sur les discomycètes. These d'etat, Faculté des sciences de Lyon: 160p.

BERTHET P., 1983 - A propos d'une récolte automnale de morille. *Bull. Soc. Linn. Lyon* 8: 240-241.

BRESINSKY A., GLASER W. und STANGL J., 1972 - Untersuchungen zur Sippenstruktur der Morchellaceen. *Ber. Bayer. Bot. Gesel.* 43: 127-143.

BROCK T.D., 1951 - Studies on the nutrition of *Morchella esculenta* Fries. *Mycologia* 43: 402-422.

BUSCOT F., 1987 - Contribution à l'étude d'une espèce de morille de la forêt du rhénane: *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier; perspectives de domestication. Thèse de l'Université de Strasbourg: 179 p.

BUSCOT F. and ROUX J., 1987 - Association between living roots and ascocarp of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 89: 249-252.

BUSCOT F., 1989 - Field observations on growth and development of *Morchella rotunda* and *Mitrophora semilibera* in relation to forest soil temperature. *Canad. J. Bot.* 67: 589-593.

BUSCOT F. and KOTTKE I., 1990 - The association of *Morchella rotunda* (Pers.) Boudier with roots of *Picea abies* (L.) Karst. *New Phytol.* 116: 425-430.

BUSCOT F., 1991 - Mycorrhizal succession and morel biology. Abstract of the 3 ESM, 19-23 August 1991, Sheffield.

BUSCOT F. and BERNILLON J. 1991 - Mycosporins and related compounds in field and cultured mycelial structures of *Morchella esculenta*. *Mycol. Res.* 95: 752-754.

BUSCOT F., 1992a - Mycelial differentiation of *Morchella esculenta* in pure culture. *Mycol. Res.* (en préparation).

BUSCOT F., 1992b - Synthesis of two types of associations between *Morchella esculenta* and *Picea abies* under controlled culture conditions. *J. Pl. Physiol.* (accepté pour publication).

CARPENTER S.E., TRAPPE J.M. and AMMIRATI J.R., 1987 - Observations of fungal succession in the Mont St. Helens devastation zone 1980-1983. *Canad. J. Bot.* 65: 716-728.

CHADEFAUD M., 1960 - *Traité de botanique*. Paris, Masson, 2: 1018 p.

COSTANTIN J., 1936 - La culture de la morille et sa forme conidienne. *Ann. Sci. Nat., Bot.* 18: 111-129.

DELMAS J. et BUNEL F., 1975 - Contribution à l'étude écologique des morilles. *Compt. Rend. Séances Acad. Agri. France*, Janv: 118-123.

FALCK R., 1920 - Wege zur Kultur der Morchelarten. *Pilz Krauterfreund* 3: 211-223, 247-255.

FOURRÉ G., 1985 - Pièges et curiosités des champignons. Niort, Chez l'auteur: 285p.

FRON G., 1905 - Sur les conditions de développement du mycélium de morille. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 140: 1187-1189.

GILBERT F., 1960 - The submerged culture of *Morchella*. *Mycologia* 52: 201-209.

GREISS H., 1940 - Befruchtungsarten bei *Morchella*. *Jahr. Wiss. Bot.* 89: 245-253.

HASELWANDER K., BOBLETER O. and READ D.J., 1990 - Degradation of ^{14}C-labelled lignin and dehydropolymer of coniferyl alcohol by ericoid and ectomycorhizal fungi. *Arch. Microbiol.* 153: 352-354.

HEIM R., 1966 - Quelques ascomycètes remarquables. *Bull. Soc. Mycol. France* 82: 442-449.

HERVEY A., BISTIG G. and LEONG I., 1978 - Cultural studies of single ascospore isolates of *Morchella esculenta*. *Mycologia* 70: 1269-1274.

IMPENS R., 1972 - Comparaison de la croissance mycélienne de deux morilles en présence de prémélanoïdes. *Bull. Rech. Agron. Gembloux* 7: 124-133.

KAUL T.N., 1975 - Studies on genus *Morchella* in Jammu and Kashmir, 1) Soil composition in relation to carpophore development. *Bull. Bot. Soc. Bengal* 29: 127-134.

KAUL T.N., 1977 - Physiological studies on *Morchella* species, 2) Nitrogen utilization. *Mushroom J.* 58: 328-332.

KONE L., 1979. Production de mycélium de morille en milieu liquide. Thèse de Docteur Ingénieur, Université de Dijon: 83 p.

LAKHANPAL T.N., SHAD O.S. and SAGAR A., 1991 - Mycorrhizae: A possible deterrent in artificial cultivation of morels. *Curr. Sci.* 60: 375-377.

LITCHFIELD J.H., 1967 - Submerged culture of morel mushroom mycelium. *Food Technol.* 21: 159-161.

MAYR R., 1982 - Untersuchungen zum Wachstum und zur Entwicklung einiger Arten der Mykorrhiza bildenden Gattung *Morchella*. *Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften*, Universität Gießen: 135 p.

MOLLIARD M., 1905 - Production expérimentale de l'appareil ascosporé de la morille. *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 140: 1146-148.

OWER R., 1982 - Notes on the development of the morel ascocarp: *Morchella esculenta*. *Mycologia* 74: 142-144.

OWER R., MILLS G.L. and MALACHOWSKI J.A., 1986 - Cultivation of *Morchella*. *U.S. Patent*, nb 4,594,809.

PETERSEN P.M., 1985. The ecology of Danish soil inhabiting pezizales with emphasis on edaphic conditions. *Opera Bot.* 77: 5-38.

RAYNER A.D.M., 1991 - The Challenge of individualistic mycelium. *Mycologia* 83: 48-71.

ROBERT E., 1865 - Relation entre la famille des oleinés et les morilles. *Bull. Soc. Bot. France* 12: 244-246.

ROZE M.E., 1883 - Le parasitisme du *Morchella esculenta* Pers. sur l'*Helianthus tuberosus* L. *Bull. Soc. Bot. France* 30: 139-143.

SCHMIDT E.L., 1983 - Spore germination of and carbohydrate colonization by *Morchella esculenta* at different soil temperatures. *Mycologia* 75: 870-875

SEKHARAM K.S., NARASIMHAM P. and ALMA B., 1978 - Determination of optimum dose and anion-cation ratio of the nutrient medium for the growth of *Morchella* sp. in submerged culture. *J. Food Sci. Technol.* 15: 78-81.

TOMMERUP J.C., BOUGHER N.L. and MALAJCZUK N., 1991 - *Laccaria fraterna*, a common ectomycorrhizal fungi with monosporic and bisporic basidia and multinucleate spores - Comparison with quadristerigmate binucleate spores *L. laccata* and the hypogeous relative *Hydnangium carneum*. *Mycol. Res.* 95: 689-698.

TURNAU K., 1984 - Post-fire cup-fungi of Turbacz and Stare Wiechy montains in the Gorge Range (Polish Western Carpathians). *Prace Botaniczne* 12: 145-170.

TURNAU K., 1987 - An emergence of *Morchella semilibera* D.C. Fr. after application of Gesaprim 50. *Prace Botaniczne* 15: 153-157.

VOLK T.J. and LEONARD T.J., 1989 - Experimental studies on the morel, 1) heterokaryon formation between monoascosporous strains of *Morchella*. *Mycologia* 81: 523-531.

VOLK T.J. and LEONARD T.J., 1990 - Cytology of the life-cycle of *Morchella*. *Mycol. Res.* 94: 399-406.

WILLIAM A., TRZCINSKI T. et WILLIAM-ENGELS L., 1956 - La croissance du mycélium de la morille. *Mushroom Sci.* 3: 283-308.

LES DÉGÂTS DE CHAMPIGNONS LIGNIVORES SUR PLATANE

C. GROSCLAUDE

I.N.R.A., Station de Pathologie Végétale,
F- 84143 Montfavet cedex

RÉSUMÉ - Des champignons basidiomycètes lignivores sont associés à l'altération du bois nommée "carie", altération qui a pour conséquence une diminution importante de la résistance mécanique des arbres. Il en est de même pour des dépérissements progressifs des branches auxquels sont associées les mêmes espèces. Ces altérations sont, le plus souvent, liées à l'existence de plaies de grande taille résultant de l'ablation de branches. Dix-huit espèces de basidiomycètes ont été répertoriées. Parmi celles-ci, on a pu démontrer expérimentalement sur Platane *in vivo*, le pouvoir lignivore de *Trametes versicolor, Fomes fomentarius* et *Bjerkandera adusta*. Les carpophores de plusieurs espèces ont été observés 14 à 30 mois après l'inoculation. Le rôle des champignons lignivores en général, leur mode d'installation et de développement ainsi que les possibilités de lutte à leur encontre sont discutés.

ABSTRACT - Lignicolous basidiomycotina are associated with wood decay which result in a significant decrease of mechanical resistance of the trees. These fungi are also associated with mortality of branches. These symptoms are often associated with the presence of large wounds requiring that the branches be pruned. Eigteen species of basidiomycotina are listed. Among them, *Trametes versicolor, Fomes fomentarius* and *Bjerkandera adusta*, which occur on plane trees, have lignivorous capacities. Fruiting bodies of several species have been noticed 14 to 30 months after inoculation. The mode of penetration, spread, development and possibilities of control of these fungi are discussed.

MOTS CLÉS : champignons lignivores, basidiomycètes, Platane, *Platanus acerifolia*, carie.

Symptômes

Les dégâts d'organismes lignivores se traduisent, d'une façon générale, par une altération de la texture du bois qui devient friable, prenant le plus souvent un aspect fibreux et une teinte claire. Ce symptôme est appelé "carie", du latin caries qui signifie pourriture.

Globalement, la carie résulte de la dégradation des principaux constituants du bois, lignine et cellulose, sous l'action d'enzymes fongiques. Dans le cas d'une pourriture fibreuse, dite encore "pourriture blanche", la lignine est totalement dégradée, tandis que la cellulose n'est que partiellement attaquée. Mais l'inverse peut aussi se rencontrer, au moins chez d'autres essences que le Platane: la cellulose est dégradée préférentiellement alors que la lignine subsiste, ce qui aboutit alors à une pourriture cubique brune.

Bien entendu, avant d'atteindre le stade de la carie, la présence d'organismes fongiques se traduit dans le bois par d'autres symptômes moins spécifiques et notamment des colorations brunes plus ou moins intenses. En outre, une fois la carie installée, le bois ainsi altéré finit par disparaître totalement sous l'action de facteurs physiques ou biotiques, des espèces animales diverses participant également à ce phénomène qui aboutit à la formation de cavernes plus ou moins importantes.

Les altérations du bois décrites ci-dessus s'observent d'une façon générale dans la partie centrale du bois des plus gros organes: troncs ou branches charpentières. A un stade plus avancé de la dégradation du bois, l'arbre devient creux, seul persistant le bois périphérique le plus jeune (aubier) qui est aussi le bois fonctionnel assurant la conduction de la sève brute.

L'observation de la localisation des altérations permet très souvent d'établir un lien entre ces dernières et de grosses plaies résultant de l'ablation de branches importantes, surtout lorsque par suite de "l'ouverture" du tronc, la carie du bois est visible extérieurement. L'évolution des altérations du bois est lente, ce qui peut expliquer en partie le fait que ces altérations se remarquent presque exclusivement sur des sujets âgés, mais au bout de plusieurs années, on peut noter le dépérissement de grosses branches. En revanche, il est rare de voir dépérir un arbre dans son ensemble sous la seule action des organismes lignivores; toutefois, il ne s'agit peut-être là que d'une apparence, car les arbres creux ayant perdu toute résistance mécanique et représentant de ce fait un danger pour l'environnement sont aussitôt abattus par leurs propriétaires (à moins que les intempéries ne se soient déjà chargées du travail), ce qui ne permet pas d'observer un éventuel dépérissement spontané de l'arbre dans sa totalité.

Les champignons responsables

Plutôt que de champignons "responsables", il convient dans un premier temps de parler de champignons associés aux dégâts constatés. En effet, sur les arbres atteints, plusieurs espèces lignicoles peuvent se manifester par la présence de carpophores et, si parmi les espèces observées par nous-mêmes sur Platane *(Platanus acerifolia)* (Tab. 1, Fig. 1 à 6), (Grosclaude & Attia, 1989), plusieurs sont connues pour posséder *in vitro* un pouvoir lignivore important, peut-on pour autant affirmer que ces espèces ou certaines d'entre elles, sont responsables des dégâts observés *in vivo* sur les platanes ? En effet, le pouvoir lignivore *in vitro* est en général évalué sur des fragments de bois stérilisés et incapables de ce fait de toute réaction (Anonyme, 1963; Eslyn & Highley, 1976).

Il faut, au préalable, rappeler que les champignons lignivores (qui appartiennent essentiellement au groupe des Basidiomycètes homobasidiés, Aphyllophorales - Théléphoracées et Polyporacées - et Agaricales), quel que soit l'hôte concerné, sont souvent considérés comme des parasites secondaires, des saprophytes ou encore des parasites de faiblesse ou de blessure. Qu'en est-il exactement ?

Parasites secondaires ? Les champignons lignivores peuvent être considérés comme tels si l'on admet suivant une opinion de plus en plus répandue, qu'ils interviennent dans leur hôte en seconde position, dans une **succession parasitaire,** après d'autres microorganismes ayant déjà colonisé en pionniers les blessures fraîches (Shigo, 1972). L'activité de ces pionniers, par eux-mêmes en général non pathogènes (mais il y a des exceptions notables), aurait alors pour conséquence de modifier le substrat dans un sens favorable au

développement des basidiomycètes lignivores. Cependant, le qualificatif de "secondaire" est ambigu car il peut laisser supposer que les champignons lignivores ne peuvent causer que des dégâts d'importance secondaire, ce qui est loin de correspondre à la vérité.

Tableau I - Champignons basidiomycètes lignicoles observés sur Platane dans la région d'Avignon.

Table I - Lignicolous basidiomycotina observed on London plane in Avignon region.

Agrocybe aegerita (Brig.) Fayod (Pholiote du Peuplier)
Auricularia auricula-judae (Bull. ex St-Amans) Wettst. (Oreille de Judas).
Auricularia mesenterica Dicks.: Fr. (Fausse Trémelle).
Bjerkandera adusta (Fr.) Karst. = *Leptoporus adustus* (Fr. ex Willd.) Quél.
Cerrena unicolor (Fr.) Murr.
Chondrostereum purpureum (Fr.) Pouz. = *Stereum purpureum* (Fr.) Fr.
Fomes fomentarius (L.: Fr.) Fr. = *Ungulina fomentaria* (L. ex Fr.) Pat. (Amadouvier).
Funalia gallica (Fr.) Bond et Sing. = *Coriolopsis gallica* (Fr.) Ryv.
Ganoderma applanatum (Pers. ex Wallr.) Pat.
Hericium erinaceus (Bull.) Pers. (Hydne hérisson).
Inonotus hispidus (Fr.) Karst. = *Xanthochrous hispidus* Pat.
Laetiporus sulphureus (Fr.) Murr. (Polypore soufré).
Lentinus tigrinus Fr.
Oxyporus late-marginatus (Dur. & Mont. ex Mont.) Donk = *Poria ambigua* Bres.
Rigidoporus ulmarius (Fr.) Imaz.
Schizophyllum commune Fr.
Spongipellis pachyodon (Pers.) Kotl. et Pouz.
Trametes versicolor (Fr.) Pil. = *Coriolus versicolor* (Fr. ex L.) Quél.

Nomenclature selon J. Breitenbach & F. Kränzlin, Champignons de Suisse, Tome 2, 1986.

Par ailleurs, si l'on considère d'autres espèces que les Platanes, il semble bien qu'il existe aussi des champignons basidiomycètes se comportant en pionniers et capables de dégrader le bois d'un arbre à la suite de l'inoculation artificielle de l'aubier sain. Tel serait le cas du *Trametes versicolor* sur Pommier (Kile & Wade, 1974). De même, le *Chondrostereum purpureum* est un agent pathogène bien connu qui attaque en pionnier le tissu ligneux des espèces fruitières. Mais on peut objecter à cela que bien souvent, l'inoculation artificielle est réalisée avec des doses massives d'inoculum, ce qui est assez éloigné de ce qui se passe spontanément dans la nature.

Saprophytes ? Un saprophyte vit aux dépens de cellules mortes: si tel est bien le cas des champignons lignivores qui s'attaquent au bois de coeur constitué essentiellement de cellules mortes, qu'en est-il lorsque l'attaque concerne l'aubier qui lui contient des cellules vivantes ? Certes, les pionniers qui se développent avant les champignons lignivores modifient les tissus, mais détruisent-ils toutes les cellules vivantes, si l'on excepte le cas particulier des pionniers pathogènes ? Par ailleurs, on a coutume de considérer à tort que les saprophytes ne sont pas dangereux et que seuls les parasites sont à redouter. Or, des champignons lignivores se comportant en saprophytes peuvent détruire le bois de coeur d'un arbre et s'avérer ainsi dans la pratique, tout aussi dommageables que de vrais pathogènes.

Parasites de faiblesse ? La manifestation tardive des dégâts attribués aux champignons lignivores, ainsi que l'apparition de leurs carpophores sur des arbres morts ou moribonds explique sans doute que ces microorganismes soient



Fig. 1 - Platane creux dont l'intérieur a été détruit par des organismes lignivores. Cet arbre vit encore grâce aux tissus périphériques encore intacts. (photo C. Grosclaude). Fig. 2 - La section d'une grosse branche est à l'origine de l'altération du bois qui s'étend profondément dans le tronc. (photo C. Grosclaude). Fig. 3 - L'altération du bois central s'est étendue aux tissus périphériques qui ont été détruits. Le tronc s'est ainsi ouvert sur une cavité de grande dimensions qui laisse encore apparaître la carie. (Photo C. Grosclaude).

Fig. 1 - Hollow tree: the inner part has been destroyed by lignicolous fungi; this tree survives due to the function of peripherical tissues which are still intact. Fig. 2 - The cutting of a limb or branch resulted in wood decay which spread deeply in the trunk. Fig. 3 - Decay of central wood has spread to peripherical tissues which have been destroyed. The trunk is open and a large cavity is noticeable which reveals wood decay ("carie").

souvent appelés "parasites de faiblesse" ce qui sous-entend qu'ils ne s'attaqueraient pas aux arbres jeunes et en bonne santé. Mais comment définir la bonne santé d'un arbre et ne confond-on pas la cause et l'effet si l'affaiblissement est provoqué par les champignons lignivores ?

En outre, l'apparition des carpophores des basidiomycètes lignivores sur des arbres morts ou moribonds ne signifie pas forcément un envahissement tardif d'arbres déjà affaiblis mais résulte plus vraisemblablement du long délai nécessaire à l'extériorisation des organes de fructification.

C'est ainsi qu'ayant inoculé des Basidiomycètes lignicoles sur des platanes atteints par le Chancre coloré (*Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani*), nous n'avons pu observer les carpophores de certaines espèces (*Lentinus tigrinus*, *Fomes fomentarius*, *Schizophyllum commune* . *Trametes versicolor* et *Bjerkandera adusta*) qu'après des délais variant de 14 à 30 mois (Tabl. 2). En revanche, aucun carpophore n'apparaissait dans des délais de cet ordre à la suite de l'inoculation par *Laetiporus sulphureus*, *Inonotus hispidus* et *Ganoderma applanatum*.

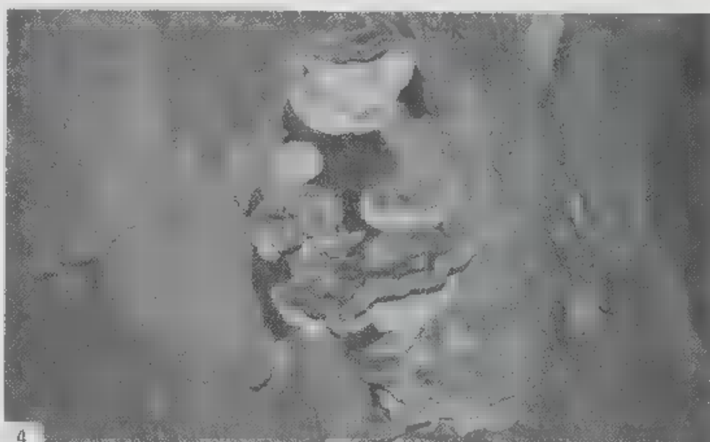
Tableau 2.

Champignons inoculés	Délai d'apparition des carpophores	Nombre d'arbres porteurs de carpophores
Lentinus tigrinus	14 à 17 mois(1)	3 (sur 14)
Fomes fomentarius	25 mois	1 (sur 28)
Schizophyllum commune	13 mois	4 (sur 5)
Trametes versicolor	14 à 25 mois	23 (sur 27)
Bjerkandera adusta	26 à 30 mois	3 (sur 14)

(1) Carpophores fugaces visibles pendant 2 à 3 mois au plus.

Parasites de blessures ? Il est exact que dans la majorité des cas, les blessures provoquées par l'homme ou encore les blessures accidentelles dues aux intempéries, mettant à nu le bois, sont à l'origine de contaminations par les champignons lignivores, mais il faut aussi considérer les portes d'entrée résultant de la chute de rameaux dans le processus d'élagage naturel (cladoptose ou décurtation). Dans ce cas également, une succession parasitaire peut être mise en évidence, qui peut aboutir, chez le Peuplier par exemple, au développement de champignons lignivores (Anselmi, 1990).

Seule l'inoculation artificielle des champignons basidiomycètes observés (ou isolés) sur Platane pourra donc permettre de leur attribuer la responsabilité d'effets pathogènes: dégradation du bois, puis éventuellement dépérissement. Mais, les inoculations artificielles doivent pour cela se rapprocher le plus possible des conditions naturelles, ce qui n'est pas aisément réalisable puisque les champignons lignivores ne sont probablement pas les premiers à intervenir. Il faut alors avoir recours à des artifices, parmi lesquels nous citerons l'inoculation de blessures anciennes et donc déjà colonisées par des espèces pionnières. C'est ainsi que nous avons pu montrer *in vivo* chez le Platane, le fort pouvoir lignivore des 3 espèces *Trametes versicolor*, *Fomes fomentarius* et *Bjerkandera adusta*.


4


5


6

Ces trois espèces avaient été inoculées à des platanes vigoureux, âgés de 5 ans, sur des blessures anciennes réalisées 9 mois auparavant par décapitation de la tige principale. Onze mois après l'inoculation, les prélèvements effectués permettaient d'observer la carie du bois sous-jacent aux blessures, sur une profondeur de 8 à 12 cm, carie à partir de laquelle les champignons inoculés étaient réisolés.

Dans un second essai, réalisé sur de jeunes platanes atteints par le *Ceratocystis fimbriata*, l'inoculation de *Trametes versicolor* et de *Fomes fomentarius*, permettait d'observer, 14 mois plus tard, après une période de vents forts, la cassure des troncs au voisinage des inoculations chez 7 et 14 arbres respectivement sur 23 et 20 sujets inoculés. Au niveau de la cassure, on apercevait un tissu de coloration jaune pâle et de texture fibreuse caractéristique des premiers stades de la carie (Grosclaude et al., 1992).

La pénétration des champignons lignivores

La pénétration des champignons lignivores s'effectue, avons-nous dit, à la faveur des blessures mettant à nu le bois. Or, une blessure fraîche est le siège d'un retrait de la sève dû au fait que cette sève se trouve pendant une grande partie de l'année sous tension. Ce retrait de la sève provoque à son tour une aspiration de l'air ambiant, de l'eau des précipitations et de toutes les particules contenues par ces éléments. Parmi ces particules qui vont être aspirées dans les vaisseaux ligneux (ou simplement déposées à la surface de la blessure lorsque cesse l'aspiration) se trouvent les germes des microorganismes les plus divers, champignons ou bactéries entre autres. Mais l'expérience montre que, paradoxalement, lorsqu'il s'agit d'aubier, des isolements pratiqués dans le bois sous-jacent aux blessures ne permettent pas de retrouver de champignons basidiomycètes lignivores et cela pendant plusieurs mois (Monk, 1976). Or comme il est évident que les spores de ces espèces ont été aspirées par la blessure au moment de sa réalisation (ou bien déposées sur celle-ci) au même titre que n'importe quelle autre espèce de microorganisme, on doit donc supposer que les spores des champignons basidiomycètes lignivores se trouvent dans un état de latence et d'inhibition qui ne permet pas leur mise en évidence par les techniques classiques.

Cette latence pourrait s'expliquer de différentes manières:
- soit parce que le bois frais est un milieu convenant mal au développement des champignons lignivores car, entre autres, trop riche en eau et trop pauvre en oxygène (Boddy & Rayner, 1983).
- soit parce que les champignons lignivores s'avèrent trop sensibles aux réactions de défense de l'hôte, réactions que peuvent au contraire surmonter les microorganismes pionniers.

Fig. 4 - Carpophores de *Trametes vresicolor* sur platane. (Photo C. Grosclaude). Fig. 5 - Carpophores de *Fomes fomentarius* (Amadouvier) développé au niveau d'une partie morte du tronc. (Photo C. Grosclaude). Fig. 6 - Fructification de *Bjerkandera adusta* sur Platane. (Photo C. Grosclaude).

Fig. 4 - Sporophores of *Trametes versicolor* on London plane. Fig. 5 - Sporophores of *Fomes tomentarius* on a dead part of a trunk. Fig. 6 - Sporophores of *Bjerkandera adusta* on London plane.

- soit encore parce qu'il existerait une dormance physiologique des spores (Merrill, 1970).

Au bout d'un temps variable (de l'ordre de 9 à 12 mois environ), les isolements pratiqués dans le bois sous-jacent a une blessure permettent enfin de mettre en évidence des champignons basidiomycètes lignivores. Si l'on ne peut exclure la possibilité d'une contamination sur des blessures âgées, il est plus vraisemblable d'expliquer cette mise en évidence tardive des basidiomycètes lignivores dans le bois par les modifications apportées au substrat du fait du développement des microorganismes pionniers. Par la suite, ces pionniers qui sont généralement de mauvais compétiteurs seront éliminés par les basidiomycètes qui les suivent.

Si la séquence blessure fraîche, pénétration de microorganismes divers, développement des pionniers, développement des basidiomycètes lignivores déjà présents, semble correspondre à la généralité des cas, des variantes sont possibles dans certains cas particuliers:

a) section d'une grosse branche mettant à nu du bois très ancien déjà duraminisé (bois de coeur). On peut penser que dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire intervenir des microorganismes pionniers, le bois de coeur étant susceptible d'être envahi d'emblée par certains basidiomycètes lignivores.

b) dépôt des spores de basidiomycètes lignivores sur une plaie ancienne où les pionniers se sont déjà développés. Il peut en être ainsi sur des plaies protégées au moment de leur réalisation par un enduit fongicide qui disparaît progressivement par la suite.

c) pénétration par les plaies résultant de l'élagage naturel. Dans ce cas également, les pionniers sont déjà présents sur les rameaux concernés par l'élagage - tout au moins dans le cas du Platane où s'observe en particulier le *Massaria platani* (Grosclaude & Romiti, 1991) - et la colonisation par des basidiomycètes lignivores peut théoriquement avoir lieu.

Développement des champignons lignivores dans le bois

Une fois implantés dans le bois, les champignons lignivores vont s'y développer, mais ce développement se fera préférentiellement dans le bois central moins riche en eau et moins réactif que l'aubier périphérique. Même lorsqu'il s'agit du bois de coeur, souvent enrichi en tanins fongistatiques, on a constaté chez le Mélèze que le développement des champignons lignivores était plus important au centre (vers la moëlle) qu'à la périphérie (au contact de l'aubier) (Cartwright, 1942); d'où l'aspect du bois altéré en cône renversé sous la blessure qui a servi de porte d'entrée aux microorganismes (le développement plus rapide des champignons dans le bois central peut expliquer en partie la plus grande vulnérabilité des blessures provoquées par l'ablation de grosses branches comparativement aux branches de petites dimensions). La colonisation du tissu ligneux par les champignons lignivores va alors se poursuivre:

- dans le sens longitudinal, relativement vite, car cette progression suit les vaisseaux qui offrent peu d'obstacles à la progression fongique, mais toujours plus vite au centre qu'à la périphérie pour les raisons qui viennent d'être évoquées plus haut.

- dans le sens transversal, la progression est au contraire bien plus lente, car il faut franchir les parois cellulaires des différents éléments constitutifs du bois: parenchymes des rayons ligneux, mais aussi vaisseaux. D'autre part, com-

me il vient d'être dit, les tissus sont de plus en plus riches en eau et de plus en plus réactifs lorsque l'on avance du centre vers la périphérie, ce qui limite encore la progression des champignons. Cette progression latérale se poursuit cependant inexorablement, l'aubier le plus ancien perdant petit à petit ses qualités par une duraminisation progressive, tandis que le cambium élabore de nouvelles assises de bois jeune.

Autrement dit, tout se passe comme s'il s'établissait entre l'arbre et les champignons lignivores présents une sorte de course de vitesse, les champignons colonisant le bois central au fur et à mesure de son vieillissement et l'arbre reformant tout au long de la saison de nouvelles couches de bois.

Conséquences du développement des champignons lignivores

La pourriture du bois central sur une plus ou moins grande longueur (branches principales et tronc) est la première conséquence prévisible résultant du développement des champignons lignivores. Puis la succession se poursuivant, dans le bois carié les champignons lignivores laisseront la place à d'autres microorganismes. Enfin, cette carie elle-même finit alors par disparaître sous l'action d'autres organismes végétaux ou animaux, remplacée par des cavités centrales limitées par la périphérie saine (aubier et écorce) des organes concernés. Dans ce cas, la pourriture centrale du tronc demeure invisible depuis l'extérieur et elle ne peut être décelée que par des sondages ou par d'autres techniques plus sophistiquées (par exemple, la thermographie infrarouge) (Catena et al., 1990).

Mais on peut imaginer que sur un secteur plus ou moins important de la circonférence, la formation de bois nouveau sain soit plus lente que la progression du champignon, ce qui pourrait être le cas d'arbres très âgés ou encore "affaiblis" pour des causes diverses. La zone de tissus altérés occuperait alors une place de plus en plus importante par rapport au bois sain: lorsqu'elle atteint l'écorce, celle-ci meurt. L'organe touché, tronc ou grosse branche, peut alors dépérir si la circonférence entière est ainsi atteinte. Si au contraire, l'altération ne concerne qu'un secteur limité de la circonférence, la branche ou le tronc encore vivants paraissent ouverts et laissent apparaître la carie ou les cavités qui en résultent (mais l'ouverture du tronc peut aussi découler d'un processus inverse: destruction d'un secteur d'écorce pour des causes diverses, biotiques ou non, d'où la mise à nu du bois qui peut alors être envahi par des espèces lignivores. Ce cas est fréquent à la base des troncs dont l'écorce a été brûlée à la suite de feux d'herbes ou de feuilles mortes). Mais, même vivants, les arbres creux constituent un danger pour l'environnement, surtout en zone urbaine ou le long des voies de communication et ils doivent être abattus sans tarder.

Peut-on lutter contre les champignons lignivores ?

Peut-on prévenir l'invasion du bois par les champignons lignivores ? Ceux-ci pénétrant par les blessures mettant le bois à nu, le meilleur moyen serait d'éviter toutes les blessures aux arbres, ce qui est rarement possible, ne serait-ce que parce que certaines blessures sont accidentelles et non voulues par l'homme. Il convient alors de protéger ces blessures, immédiatement avec un enduit fongicide de bonne qualité; mais nous savons que la persistance de ces enduits est limitée et que leur efficacité concerne en premier lieu les organismes pionniers (parmi lesquels existent, il est vrai, de redoutables pathogènes comme le *Ceratocystis fimbriata* agent du Chancre coloré). Par ailleurs, sur de grosses

plaies on ne peut raisonnablement envisager de renouveler périodiquement l'apport d'enduit fongicide jusqu'au recouvrement complet de celles-ci (cicatrisation).

Enfin, quelles que soient les précautions prises (suppression de toute blessure volontaire, protection des blessures accidentelles), il ne sera jamais possible de supprimer l'élagage naturel qui est à l'origine de blessures par lesquelles pourront s'introduire des champignons lignivores. Un progrès pourrait toutefois résulter de l'application sur les blessures d'un champignon tel que le *Trichoderma harzianum*, antagoniste connu d'au moins un champignon basidiomycète lignicole, le *Chondrostereum purpureum* (Grosclaude, 1970; Grosclaude et al., 1974) et qui a l'avantage de persister un certain temps dans les tissus qu'il colonise. De même, on pourrait envisager d'adapter au platane le traitement appliqué sur vigne pour lutter contre la maladie de l'Esca dans laquelle interviennent des basidiomycètes lignivores. Celle-ci, on le sait depuis fort longtemps, est efficacement contrôlée par l'arsénite de sodium. On a tenté d'arrêter le développement des pourritures provoquées par les champignons lignivores en éliminant par curetage le bois pourri ou en voie d'altération. Cette méthode qui ressort de ce qu'il est convenu d'appeler "chirurgie arboricole" (de Ribier, 1985) est, faut-il le préciser, difficile et longue à mettre en oeuvre. Par ailleurs, en dépit de l'intérêt esthétique des opérations, il n'est pas possible actuellement d'affirmer qu'une telle pratique améliore sensiblement l'état sanitaire des arbres et puisse augmenter leur durée de vie.

Conclusion

Parmi les champignons basidiomycètes dont nous avons observé les carpophores sur le Platane, se trouvent donc des espèces susceptibles de dégrader le bois d'arbres jeunes et vigoureux. Par ailleurs, le long délai - atteignant deux ans et plus - qui s'écoule avant d'observer les carpophores sur les arbres inoculés, conforte l'hypothèse selon laquelle ces espèces ne s'attaquent pas uniquement aux arbres âgés ou affaiblis, mais sont eux-mêmes responsables de l'affaiblissement des sujets envahis. Ces espèces peuvent donc être considérées comme des agents pathogènes sensu lato même si la durée trop brève de nos essais n'a pas permis d'aboutir au dépérissement de tout ou partie des sujets inoculés. Quant à la lutte à l'encontre de ces champignons, l'impossibilité d'éviter toute blessure, la protection partielle et temporaire résultant de l'application sur les blessures d'un enduit fongicide et le succès douteux des tentatives de lutte curative par chirurgie arboricole, laissent en définitive peu d'espoir d'éviter les dégâts qu'ils peuvent provoquer.

La limitation du nombre et des dimensions des blessures volontaires, la protection de celles-ci ainsi que de toutes les autres, accidentelles notamment, par des enduits fongicides sont cependant susceptibles de réduire l'intensité des dégâts et peut-être de retarder la mort des arbres consécutive au dépérissement des grosses branches puis du tronc. Ces mesures peuvent aussi permettre de différer sinon d'éviter l'abattage d'arbres devenus creux.

Il y aura donc toujours, tôt ou tard, des arbres creux, mais plutôt que de regarder ceux-ci comme des malades, ne faut-il pas les considérer comme autant d'écosystèmes en évolution, hébergeant une foule d'organismes végétaux et animaux, des bactéries aux oiseaux et aux petits mammifères en passant par les insectes et les champignons ? Et les actions successives de chacun d'entre eux concourent finalement au recyclage de la matière organique de ce qui fut un arbre et de tout l'écosystème en général. Ainsi, l'arbre creux, après avoir servi de

refuge aux espèces les plus diverses, redeviendra le substrat sur lequel pourront se développer de nouveaux arbres.

Remerciements: Nous remercions le Conseil Général de Vaucluse pour l'aide qu'il nous a accordée dans la réalisation de ce travail. Ce travail a bénéficié également de l'aide du Ministère de l'Environnement.

BIBLIOGRAPHIE

ANONYME, 1963 - American Society for Testing and Materials. Standard method for accelerated laboratory test of natural decay resistance of woods. ASTM D 2017 1916 Race St. Philadelphia Pa.

ANSELMI N., 1990 - Wood deterioration in poplars following decline after water stress. *Eur. J. Forest Pathol.*, 20: 321-328.

BODDY L. and RAYNER A.D., 1983 - Origins of decay in living deciduous trees: the role of moisture content and a re-apparaisal of the expanded concept of tree decay. *New Phytol.*, 94: 623-641.

CARTWRIGHT K.ST.G., 1942 - The variability to decay of the heartwood of home-grown european larch, *Larix decidua* Mill. (*L. europaea*) and its position in the log. *Forestry* 16: 49-51.

CATENA G., PALLA M. and CATALANO M., 1990 - Thermal infrared detection of cavities in trees. *Eur. J. Forest Pathol.* 20: 201-210.

DE RIBIER B., 1985 - La chirurgie arboricole: une prophylaxie efficace. *Phytoma* 367: 42-43.

ESLYN W.E. and HIGHLEY T.L., 1976 - Decay resistance and susceptibility of sapwood of fifteen tree species. *Phytopathology* 66: 1010-1017.

GROSCLAUDE C., 1970 - Premiers essais de protection biologique des blessures de taille vis-a-vis du *Stereum purpureum* Pers. *Ann. Phytopathol.* 2: 507-516.

GROSCLAUDE C., DUBOS B. and RICARD J.-L., 1974 - Antagonism between ungerminated spores of *Trichoderma viride* and *Stereum purpureum*. *Pl. Dis. Reporter* 58: 71-74.

GROSCLAUDE C. et ATTIA C., 1989 - Champignons lignicoles, parasites de blessures sur Platane. *Phytoma* 404: 56-58.

GROSCLAUDE C. et ROMITI C., 1991 - Massaria platani, champignon parasite peu connu sur Platane. *P.H.M.-Revue horticole* 321: 46-47.

GROSCLAUDE C., OLIVIER R. et ROMITI C., PIZZUTO J.-C., 1992 - Sur Platane, pouvoir lignivore de quelques champignons basidiomycètes. *Phytoma* 436: 64-66.

KILE G.A. and WADE G.C., 1974 - *Trametes versicolor* on apple. I- Host-pathogen relationship. *Phytopathol. Z.* 81: 328-338.

MERRILL W.,1970 - Spore germination and host penetration by heartrotting hymenomycetes. *Annual Rev. Phytopathol.* 8: 281-300.

MONK V., 1976 - Microbial colonisation of pruning wounds, with particular reference to Oak, *Quercus robur*. Thèse Univ. of Surrey. Abstract in *Diss. Abstr. Int., Ser. C*, 37 (1): 88.

SHIGO A.L., 1972 - Successions of microorganisms and patterns of discoloration and decay after wounding in red oak and white oak. *Phytopathology* 62: 256-259.

Source : MNHN, Paris

CONTAMINATION FONGIQUE DE SALAISONS SÈCHES DE VIANDE: ORIGINE, CONDITIONS D'APPARITION, PRÉVENTION

Joseph LE BARS et Pierrette LE BARS

Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, 180 Chemin de Tournefeuille, 31931 Toulouse

RÉSUMÉ - Des altérations fongiques tardives de salaisons sèches de viande étaient dues au *Penicillium frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Wehmer) Westling) sur le corps des saucissons et à l'*Aspergillus repens* de Bary (= *Eurotium repens* de Bary) aux extrémités. L'analyse des matières premières, de l'air et des surfaces des différentes salles et du matériel ont mis en évidence l'origine de ces contaminants: - l'*A. repens* provenait du poivre; le *P. frequentans* présent dans toute l'entreprise, [redacted] développait dans les séchoirs. L'étude écologique de ces deux espèces comparativement au *P. nalgiovense* Laxa (la "fleur" ensemencée) explique la localisation et le moment de leur développement. Des contaminations volontaires aux différents stades ont montré que la période sensible se situe en amont des étuves. Un ensemble de mesures (décontamination du poivre, modifications dans les séchoirs pour limiter le développement du *P. frequentans*, réduction du croisement des circuits) ont éliminé plus de 80% des altérations ultérieures. La recherche de souches de *P. nalgiovense* et *P. chrysogenum* Thom plus compétitives compléterait cette prévention.

ABSTRACT - Delayed fungal impairments ("green mold") appeared in mold ripened sausages: *Penicillium frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Wehmer) Westling) on the sausage body and *Aspergillus repens* de Bary (= *Eurotium repens* de Bary) on the ends. Mycological studies on raw materials, air and surfaces of different rooms led to determine their origins: - *A. repens* came from pepper; - *P. frequentans*, present everywhere in the factory, grew in ripening rooms. Ecological study of these species, in comparison with *P. nalgiovense* Laxa (starter mold), explained their development localisation and period. Experimental contaminations at different steps of the process outlined that the critical moment took place before incubators. Comprehensive measures to limit development (in ripening rooms), origin and cross contamination eliminated more than 80% impairments. Investigations on more competitive strains of *P. nalgiovense* and *P. chrysogenum* Thom would improve such a prevention.

MOTS CLÉS : salaisons, moisissures, *Penicillium frequentans*, prévention.

INTRODUCTION

La salaison est un mode de préparation et de conservation de la viande qui fait appel à un ensemble de techniques comprenant le salage, la dessication et la fermentation. Dans l'industrie, cette dernière est dirigée par l'apport de microorganismes spécifiques en tant qu'agents de maturation, ayant chacun un rôle particulier: bactéries, levures et champignons filamenteux. Ces derniers, dénommés "la Fleur" par les professionnels, ont pour but d'obtenir une couver-

ture uniforme des produits participant ainsi à une meilleure maîtrise des différents aspects de la qualité: présentation, hygiène, goût. Les souches principalement utilisées appartiennent à l'espèce *Penicillium nalgiovense* Laxa, depuis les nombreux travaux effectués en Allemagne sur ce sujet (voir les mises au point de Benard & Labie, 1977 et de Moreau, 1978), notamment ceux de Mintzlaff & Leistner (1972).

Malgré l'emploi d'une telle flore de surface, une grande entreprise de salaisonnerie subissait un préjudice croissant (disqualification, retour de marchandises) du fait du développement tardif de "moisissure verte" sur des saucissons et des saucisses sèches.

L'objet de cette communication est de rapporter la stratégie suivie et les résultats obtenus dans l'analyse d'un tel problème de contamination dans une industrie agro-alimentaire relativement complexe du fait de la diversité des matières premières, des étapes technologiques et des microorganismes utilisés:

- nature des contaminants:
- leurs conditions de développement comparativement à la "fleur" ensemencée,
- leur origine: les matières premières, l'usine, la conservation,
- les moments critiques de la contamination.

I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Nature des contaminants

A partir d'une trentaine d'échantillons (saucissons, saucisses sèches) macroscopiquement contaminés, les "moisissures vertes" furent isolées sur un milieu gélosé au malt (2 %) hypersalé (NaCl 3 %, comme les salaisons). Elles furent identifiées selon les techniques et critères de Raper & Thom (1968) pour le genre *Penicillium* et ceux de Raper & Fennell (1965) pour le genre *Aspergillus*.

L'objectif majeur de cette première étape étant de déterminer si la nature de ces contaminations était constante ou non dans cette entreprise, ces observations ont porté sur plusieurs lots de fabrication, après conservation des produits pendant un à deux mois dans les conditions habituelles de distribution: sous emballage, sous cellophane perforée ou sous atmosphère modifiée (N_2 + CO_2).

2. Etude comparative de la croissance des souches isolées

Pour la comparaison de la croissance des trois espèces isolées en fonction de la température, les souches furent ensemencées au centre de boîtes de Pétri (90 mm) sur le milieu précédent à raison de trois répétitions par souche; au cours de l'incubation à 5, 10, 15, 20, 25, 30 et 35°C, la croissance radiale fut mesurée quotidiennement pendant 3 semaines. L'influence comparée de la concentration en NaCl (1, 3, 6 et 9 %) fut examinée selon la même technique au cours de l'incubation à 15°C, température des séchoirs.

La compétition entre les deux espèces fongiques contaminantes et la "fleur" *(Penicillium nalgiovense)* fut estimée par la dominance éventuelle après croisement des lignes d'ensemencement sur le milieu au malt hypersalé (3 %) incubé à 15°C.

3. Recherche de l'origine des contaminants

Le *P. frequentans* et l'*A. repens* ont été recherchés dans toutes les matières premières: mêlée, viande et résidus au poussage, menu de porc, chaudin, ficelle, poivre, talc et la suspension de la flore d'ensemencement. Des prélèvements de surface furent effectués à l'aide de coton-tiges stériles humidifiés sur 10cm² délimités par des pochoirs stériles sur les tapis de transport, les surfaces de travail, le matériel, les chariots avec les barres de suspension des produits, les climatiseurs...; l'extrémité des coton-tiges est sectionnée et fortement agitée dans 5 ml de solution aqueuse de Tween 80 (0,5 ‰); les suspensions, avant et après dilution, sont ensemencées sur le milieu au malt hypersalé (3 ‰).

Des prélèvements d'air (30 à 150 litres) ont été réalisés tout au long des circuits de la fabrication à l'aide de l'appareil à cribles successifs d'Andersen (1958), équipé du milieu au malt hypersalé. L'analyse qualitative (structure du nuage particulaire,...) et quantitative (concentration en particules portant au moins l'un des contaminants fongiques) fut effectuée selon une méthode décrite précédemment (Le Bars, 1968).

La localisation de l'apparition macroscopique des contaminants dans les différents séchoirs fut relevée pendant deux mois. L'humidité relative (H.R.) fut enregistrée en permanence dans ces différentes zones; l'H.R. moyenne fut déterminée par la mesure de l'aire sous la courbe de chaque cycle (100 minutes) de variation de l'H.R. imposée par la technologie (tableau 1).

Etapes	Durée	Température	Hygrométrie
Fabrication de la mêlée	24 h	0 - 2°C	85 %
Poussage et ensemencement	2 h	10 - 15°C	80 %
Etuves	70 h	25 → 15°C	100 → 80 %
Séchoirs	10-30 j	12 - 15°C	cycles 60 à 80 % (100h)

Tableau 1: Durée et caractéristiques hygro-thermiques des principales étapes de la fabrication des saucissons.

Table 1: Period and hygro-thermal characteristics of the main steps in cured dried sausage manufacture.

4. Détermination du moment principal de la contamination

Après fabrication des produits et leur ensemencement par la fleur, des contaminations volontaires ont été effectuées par application sur des saucissons (18 par lot) de cultures de la même souche de *P. frequentans* à différents stades (tableau 1): à l'entrée dans une étuve, dans un séchoir et après deux semaines de séchage. Dans le séchoir, ces lots ont été placés dans des zones qui s'avéraient plus favorables à ce contaminant. Le délai et la fréquence d'apparition de la "moisissure verte" furent relevés au cours des 5 semaines après la fabrication.

II - RESULTATS

1. Nature des contaminants

Les souches de "moisissures vertes" isolées du corps des saucissons et des plis de saucisses appartenaient toutes à l'espèce *Penicillium frequentans* Westling (= *P. glabrum* (Wehmer) Westling); celles isolées de l'extrémité supérieure des saucissons, près du point d'attache, étaient l'*Aspergillus repens* de

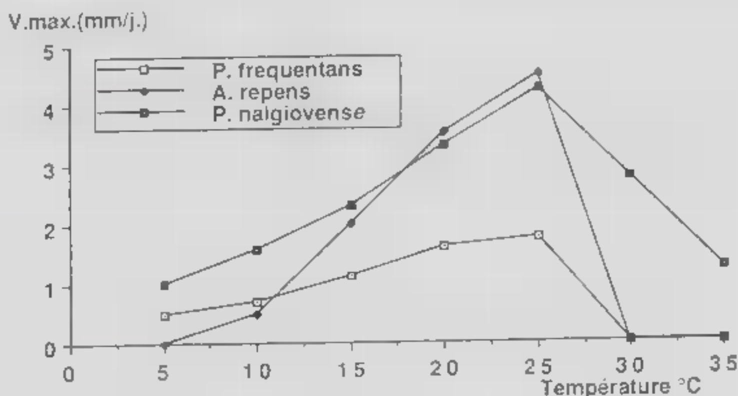


Figure 1 - Vitesse maximale de croissance des deux contaminants de salaisons et de la "fleur" *(P. nalgiovense)* en fonction de la température.

Figure 1: Maximal growth rate (mm/day) of the two fungal contaminants of cured dried sausages comparatively to the starter *(P. nalgiovense)* according to temperature.

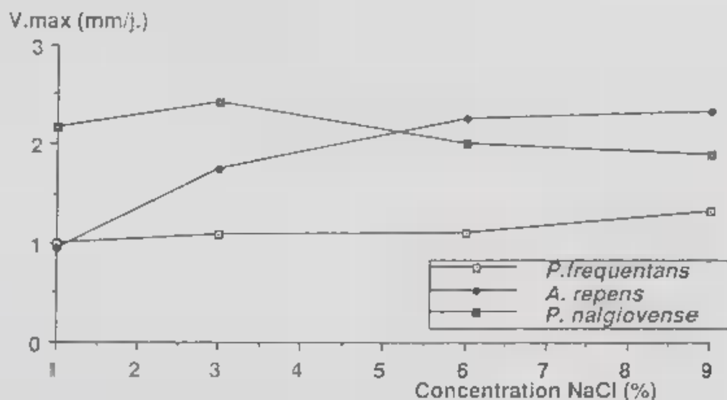


Figure 2 - Vitesse maximale de croissance des deux contaminants de salaisons et de la "fleur" *(P. nalgiovense)* en fonction de la concentration en NaCl.

Figure 2 - Maximal growth rate (mm/day) of the two fungal contaminants of cured dried sausages comparatively to the starter *(P. nalgiovense)* according to NaCl content.

Bary (= *Eurotium repens* de Bary). La flore fongique d'ensemencement était le *P. nalgiovense* Laxa.

2. Etude comparative *in vitro* des trois espèces

L'ensemble des mesures de croissance radiale peut se résumer par le calcul et la représentation de la vitesse maximale de croissance en fonction du paramètre étudié (figures 1 et 2). La température optimale de croissance fut voisine de 25 °C pour les trois souches. Le *P. nalgiovense* présenta la plus large gamme de températures favorables (< 5°C - > 35°C); à une température de 10-12°C, sa vitesse d'extension fut le double de celle des contaminants. A 30°C, la croissance des deux contaminants fut inhibée, tandis qu'à 5°C seul le *P. frequentans* se développa de façon notable.

L'ensemble de l'étude de la croissance en fonction de la concentration en NaCl est résumé dans la figure 2. Le *P. frequentans* apparait indifférent à la concentration, tandis que l'*A. repens* manifeste une nette halophilie. Quant à la souche de *P. nalgiovense*, sa vitesse de croissance, peu influencée par la teneur en sel, fut à la fois maximale et nettement supérieure à celle des contaminants pour une concentration en sel de 3 %.

L'étude de compétition *in vitro* entre les trois souches mit en évidence que le *P. frequentans*, malgré une vitesse de croissance inférieure, dominait toujours la fleur après une semaine de culture. Par contre, l'*A. repens* fut nettement dominé par le *P. nalgiovense* et le *P. frequentans*, dans les conditions de concentration en sel (3 %) et de température analogues à celles de la fabrication.

3. Origine des contaminants

• Les matières premières:

De toutes les matières premières, seul le poivre, théoriquement décontaminé, présentait une mycoflore abondante:

Aspergillus gr. *glaucus* (dont *A. repens*)	$4{,}5.10^5$/gramme
A. restrictus	6.10^4
A. candidus	4.10^4
A. versicolor	$1{,}5.10^4$
A. niger	5.10^3
A. wentii	6.10^3
A. flavus	4.10^3
Penicillium spp (*P. frequentans* non détecté)	6.10^3

• L'entreprise:

Les prélèvements de surface en amont des salles-étuves furent négatifs pour le *P. frequentans*, à l'exception des chariots et des barres pour la suspension des produits, qui circulent de la salle de poussage aux séchoirs et inversement (120 à 1800 propagules/10 cm²).

La contamination aérienne par cette espèce était générale dans l'entreprise (tableau 2), avec un niveau élevé dans les séchoirs, surtout en fin de cycle (11660 particules/m³ véhiculant au moins un propagule de *P. frequentans*). Parmi les autres espèces fongiques, des *Cladosporium*, contaminants fréquents des entreprises agro-alimentaires traditionnelles, étaient présents sur toutes les instal-

Lieu / Espèces	A.E.	Fab.	A.C.	Pouss-Ens		Passage	Etuves		Séchoirs		Talcage
							Déb.	Fin	Déb.	Fin	
P. frequentans		**50**		**320**	**200**	**215**	**28**	**35**	**2110**	**11660**	**2100**
Autres *Penicillium*		150	6	80	120	210	42	71	9		
Asp. gr. glaucus			3	80	72	27	7	18			
A. versicolor		30				18	7				
Cladosporium sp	133	40	3	9	15		14	107			
Autres dématiées	490	87		18							
P. nalgiovense		*1170*		*7360*	*7170*	*26800*	*4130*	*2700*	*80300*	*214300*	

Tableau 2: Etude qualitative et quantitative (nombre de propagules par m^3) de la mycoflore halotolérante (milieu au malt hypersalé, NaCl 3%) de l'air de différentes salles de l'entreprise de salaisonnerie. - A.E.: air extérieur, au niveau de la production frigorifique. Fab: salle de fabrication (ventilation en marche). A.C.: air comprimé (détendu sous une bâche). Pouss-Ens: salle de poussage et ensemencement de la "fleur". Passage: passage vers étuves (proche de la réserve des barres de bois). Etuves: déb. début (3 h après désinfection); fin: fin d'étuvage. Séchoirs: début (déb.) et fin de cycle. Talcage: brossage + talc.

Table 2: Qualitative and quantitative (propagule number / m^3) of halotolerant mycoflora (malt medium with 3% NaCl) in the air of different rooms along the cured sausage factory. - A.E.: external air, close to refrigerating unit. Fab.: mixing room (ventilation on). A.C.: compressed air (expanded under a plastic sheet). Pouss-ens.: sausage making and fungal starter seeding. Passage: way to incubators (close to wooden bars for sausage hanging). Etuves: incubators: déb = start (3h after disinfection); fin = end of incubation. Séchoirs: drying and ripening step; déb = start; fin = end. Talcage: sausage brushing + talc powdering.

lations (5 à 10 propagules/10 cm^2) et dans l'air de toutes les salles, principalement en amont, près des sources de conditionnement d'air.

La fréquence et l'importance du développement macroscopique du *P. frequentans* étaient plus grandes dans les zones des séchoirs où l'humidité relative, surtout l'H.R. minimale, était plus élevée (figure 3).

4. Moment critique de la contamination

Les résultats de l'essai de contamination volontaire sont représentés sur la figure 4. Pratiquement toutes les unités ensemencées avant l'entrée dans les étuves présentaient un développement macroscopiquement visible du *P. frequentans* à la fin du séchage (5 semaines); par contre, les contaminations tardives, après un début de séchage ne provoquaient pas d'altération visible.

III - DISCUSSION

Les produits non stérilisés issus des industries agro-alimentaires sont parfois le siège de développement de moisissures indésirables. Une prévention

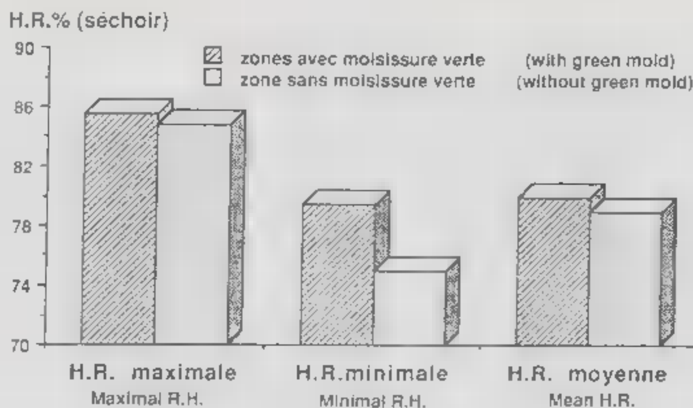


Figure 3 - L'humidité Relative (H.R.) maximale, minimale et moyenne dans les zones des séchoirs avec et sans développement de "moisissures vertes".

Figure 3 - Maximal, minimal and mean Relative Humidity in areas with or without development of "green molds".

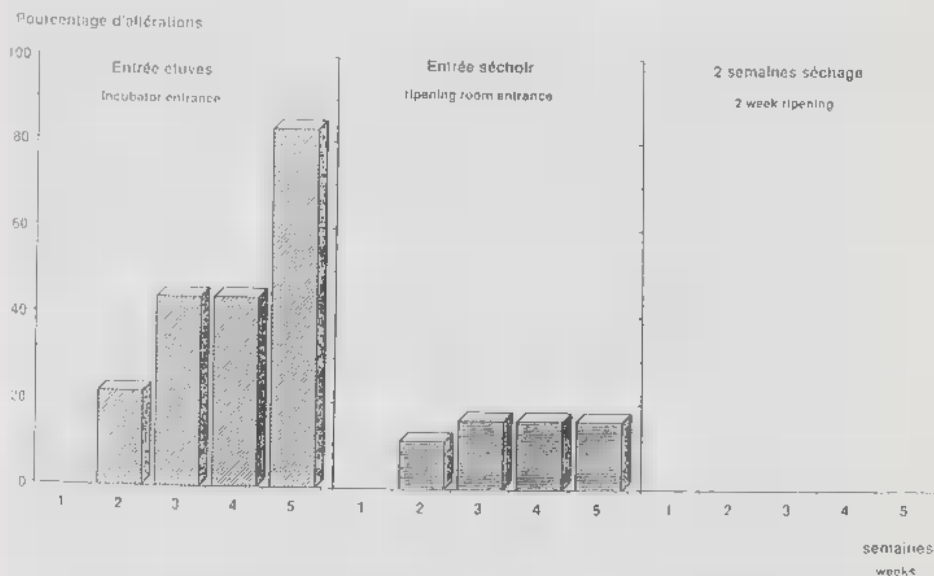


Figure 4 - Pourcentage de saucissons présentant de la "moisissure verte" au cours de la maturation et de la conservation en fonction du moment de la contamination artificielle par une culture de *P. frequentans*.

Figure 4 - Percentages of sausage with the "green mold" development during maturation and storage according to the moment of experimental contamination with a *P. frequentans* agar culture.

raisonnée, surtout dans les industries de fermentation, doit être basée sur la connaissance des agents fongiques, de leur origine, des moments de la contami-

nation et des conditions d'apparition des altérations. Ceci impose généralement l'analyse des différentes étapes en étroite collaboration avec les responsables de la production.

De nombreuses espèces fongiques ont été décrites sur les salaisons sèches de viande (voir les mises au point de Benard & Labie, 1977 et de Moreau, 1978). Dans le cas présent, les défauts d'aspect relevés en fin de maturation et dans les circuits de distribution résultaient toujours des développements des mêmes espèces fongiques. Le contaminant mineur, l'*A. repens*, provenait principalement d'une des matières premières, le poivre: la mesure immédiate consistant à utiliser exclusivement du poivre décontaminé, comme il est recommandé dans ce type d'industrie (Anonyme, 1986; Moreau, 1972; Moreau & Moreau, 1978; Le Bars & Le Bars, 1988) a été suivie par une disparition quasi-totale de ce type d'altération en quelques semaines. Les autres caractéristiques biologiques de l'*A. repens* expliquent la localisation exclusive de son développement à l'extrêmité des saucissons, où la diminution de l'activité en eau et l'accroissement de la concentration en sel limitent l'implantation de la "fleur"; en effet, cette espèce est plus xérophile et halophile et moins compétitive que le *P. nalgiovense*. Enfin, la conservation des produits après maturation à une température inférieure à 10°C devrait, en outre, limiter son développement comparativement à la "fleur".

La contamination majeure était toujours dûe à la même espèce fongique, le *P. frequentans*, quels que soient les lots de fabrication. Non détectée dans les matières premières cette espèce était présente à tous les niveaux de l'entreprise. Compte tenu de ses caractéristiques écologiques, voisines de celles du *P. nalgiovense*, elle se développait surtout dans les séchoirs malgré une bonne implantation préalable de la "fleur"; en effet, son pouvoir de compétition lui permet de s'exprimer à terme malgré un ensemencement et une vitesse de croissance plus faibles que le *P. nalgiovense*.

La contamination volontaire des saucissons à différents stades a permis de préciser le moment le plus important de la contamination: avant l'entrée dans les étuves.

En ce qui concerne la prévention, la pratique d'un vide sanitaire avec désinfection simultanée de l'ensemble d'une telle entreprise est irréaliste, car il la condamne à un arrêt de deux mois pour l'obtention et la fourniture de produits finis.

L'ensemble des observations et des résultats a permis de mettre en place une prévention visant, d'une part, à réduire la source du *P. frequentans*, entretenue au sein de l'entreprise, et, d'autre part, à en limiter la dissémination.

• L'efficacité de la désinfection de chaque séchoir, en fin de cycle de maturation, a été améliorée par l'emploi d'un procédé de thermonébulisation, assurant une meilleure diffusion et stabilité de l'aérosol. L'obtention d'une plus grande homogénéité de l'humidité relative au cours des cycles de variation a permis de réduire les zones à risques et, de ce fait, le développement du contaminant. Ces mesures ont conduit, en moins de deux mois, à une pollution cent fois moins importante dans les séchoirs en fin de cycle, principale source du *P. frequentans* (figure 5).

• La réduction de la dissémination des spores a été assurée par la mise en place progressive d'un ensemble de dispositions habituelles: - désinfection du matériel roulant (chariots) avant leur retour à la salle de fabrication; - limitation au minimum du croisement des circuits; - mise en surpression de l'air de la salle

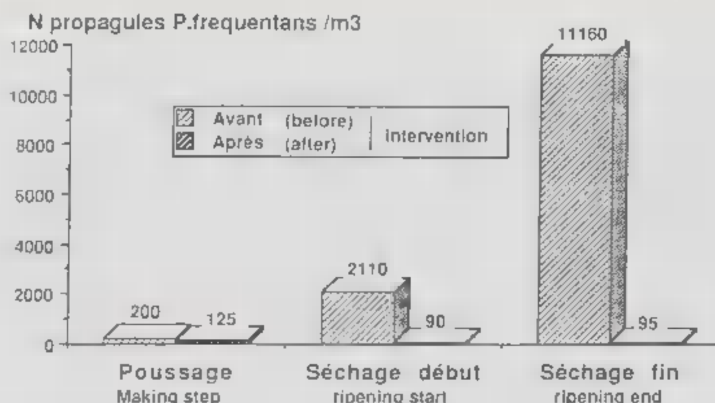


Figure 5 - Pollution de l'air par le *P. frequentans* avant et après la mise en place de la prevention.

Figure 5 - Aerial contamination levels for *P. frequentans* before and after application of prevention measures.

de poussage-ensemencement; - formation et participation active du personnel à cette opération de prévention.

Au cours de l'année qui a suivi la mise en place de ces dispositions, l'importance des altérations fongiques a été reduite de plus de 80 %.

Dans la littérature (voir les mises au point de Benard & Labie, 1977 et de Moreau, 1978), de nombreux contaminants fongiques, parmi lesquels les deux espèces étudiées sont relativement fréquentes, ont été relevés sur les salaisons sèches de viande il y a plus de 15 ans, principalement à l'étranger, sans préciser les mécanismes et l'origine de ces contaminations. Il conviendrait de vérifier, dans le contexte actuel de la technologie, sur l'ensemble de la production quelle est la nature, la fréquence et l'importance de ces altérations. En effet, à l'heure où l'on prône la qualité des denrées, la moindre altération (aspect, goût, innocuité, ...) jette le discrédit sur un type de produit.

Dans ce domaine de production agro-alimentaire, le *P. nalgiovense* apparait particulièrement adapté aux fonctions qui lui sont dévolues; en particulier, il présente, comparativement aux contaminants examinés, une plus grande vitesse de croissance, une plus large gamme de températures favorables et un optimum de croissance à la concentration en sel utilisée. D'autre part, il empêche le développement de moisissures indésirables si la contamination est nettement postérieure à son implantation. Par contre, le pouvoir de compétition de la souche utilisée est mis en défaut pour certaines contaminations précoces *(P. frequentans)*; aussi, un des élements biologiques complémentaires de la prévention devrait être la recherche de souche de "fleur" *(P. nalgiovense, P. chrysogenum)* plus compétitives.

REFERENCES

ANDERSEN A.A., 1958 - New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J. Bacteriol.* 76: 471-484.

Anonyme, 1986 - Arrêté du 01-09-1982, modifié par A. du 06-01-1986, J. Off. Rép. Fr. du 28-01-1986 - Arrêté 04-08-1986; J. Off. Rép. Fr. du 22-08-1986.

BENARD G. et LABIE C., 1977 - Moisissures et mycotoxines dans les salaisons de viande sèches. *Rev. Méd. Vét.* 128: 795-995.

LE BARS J., 1968. Flore atmosphérique des locaux d'élevage en aviculture. Propriétés physiques et biologiques. *Rev. Méd. Vét.* 144: 1163-1189.

LE BARS J. et LE BARS P., 1988. Contamination fongique et mycotoxique des plantes pour infusions et de condiments. *Bull. Soc. France Mycol. Méd.* 17: 379-384.

MINTZLAFF H.J. und LEISTNER L., 1972 - Untersuchungen zur Selektion eines technologisch geeigneten und toxikologisch unbedenklichen Schimmelpilz-Stammes für die Rohwurst-Herstellung. *Zbl. Vet. Med., B,* 19: 291-300.

MOREAU C., 1972 - Contrôle mycologique d'une station de surgélation de plats cuisinés. *Rev. Gén. Froid* 63: 691-696.

MOREAU C., 1978 - Moisissures et mycotoxines dans les viandes et les produits de charcuterie. Brest, Univ. Bret. Occid., 25p.

MOREAU C. et MOREAU M., 1978 - La contamination des épices, ses conséquences dans les industries alimentaires. *Ind. Alim. Agric.*, 497-502.

RAPER K.B. and FENNELL D.I., 1965 - *The genus Aspergillus.* Baltimore, Williams & Wilkins Co, 686p.

RAPER K.B. and THOM C., 1968 - *A manual of the Penicillia.* N.Y., Hafner Pub. Co., 875p.

DE LA BIOLOGIE DES HYPHOMYCÈTES AQUATIQUES A L'ÉCOLOGIE DES RIVIÈRES

Eric CHAUVET

Centre d'Écologie des Ressources Renouvelables (CNRS)
29, rue Jeanne Marvig, 31055 Toulouse Cedex.

RÉSUMÉ - Les hyphomycètes aquatiques sont distribués à travers le monde entier dans les eaux continentales, principalement courantes. Ces champignons produisent de nombreuses conidies dont la morphologie est typiquement adaptée à la colonisation des substrats submergés dans les rivières. La répartition des espèces et la composition des communautés sont surtout influencées par la température et la qualité de l'eau, mais probablement aussi par d'autres facteurs tels que l'altitude et la nature de la végétation riveraine. Les hyphomycètes aquatiques sont impliqués dans la décomposition des litières, processus majeur du fonctionnement écologique des rivières. Ces champignons possèdent des enzymes de type cellulase, phénol-oxydase, pectinase, lipase, protéase et amylase. Leur activité provoque le "conditionnement" et la macération du matériel végétal, entraînant à la fois une assimilation accrue des litières par les invertébrés aquatiques et la libération d'une matière organique particulaire fine.

ABSTRACT - Aquatic hyphomycetes are found throughout the world in continental, mostly running waters. These fungi produce a great number of conidia whose morphology is well adapted to the colonization of substrata submerged in streams. The distribution of aquatic hyphomycete species and the composition of communities are mainly influenced by the temperature and the water quality of rivers, but are possibly controlled by other environmental factors (e.g. the altitude and the nature of the riparian vegetation). Aquatic hyphomycetes are involved in litter decomposition which is a key process in river functioning. The enzymatic equipment of these fungi include cellulase, phenol oxydase, pectinase, lipase, protease and amylase. Their activity cause the conditioning and the maceration of plant matter resulting both in an enhanced assimilation by stream invertebrates and in the release of fine particulate organic matter.

MOTS CLÉS : hyphomycètes aquatiques, décomposition, écologie, mycologie.

LES HYPHOMYCETES AQUATIQUES

L'étude des hyphomycètes aquatiques a connu un essor singulier après les premiers travaux d'Ingold (1942) et, surtout dans le domaine écologique, depuis le début des années 1970 (Barlocher & Kendrick, 1974; Kaushik & Hynes, 1968, 1971; Suberkropp & Klug, 1976; Triska 1970). Dans le même temps, des progrès considérables ont été faits dans la connaissance systématique de ce groupe de champignon et dans la découverte de nouvelles espèces. Ainsi, seule une quinzaine d'espèces était connue il y a 50 ans alors que désormais près de 300 espèces d'hyphomycètes aquatiques sont signalées à travers le monde, la moitié d'entre-elles ayant été découverte au cours des dix dernières années (Descals, comm. pers.; Webster & Descals, 1981). Si plusieurs auteurs préfèrent

parler de champignons Ingoldiens (Bärlocher, 1982; Webster & Descals, 1981) c'est parce que le groupe de champignons étudié par Ingold correspond à une certaine entité biologique et écologique, tandis qu'il est hétérogène du point de vue systématique puisqu'il renferme de nombreux Champignons Imparfaits, des Ascomycètes et quelques Basidiomycètes. En fait, on découvre régulièrement les relations existant entre les stades anamorphes et téléomorphes de champignons Ingoldiens. En 1979, Webster et Descals signalaient déjà douze espèces dont les stades conidiens et sexués avaient été mis en évidence. Depuis, de nouvelles connexions ont été signalées (p. ex., Abdullah et al., 1981; Webster et al., 1991). Dans ce sens, la classification actuelle des espèces anamorphes, basée sur la différenciation des espèces et des genres par les caractères de la conidiogénèse et de la morphologie conidienne, n'est pas satisfaisante et sera assurément reconsidérée par les taxonomistes dans quelques années.

Caractères biologiques

La biologie de ces champignons est caractérisée par une sporulation typiquement aquatique, bien que plusieurs cas de sporulation en milieu terrestre aient été signalés (p. ex., Bandoni. 1981; Sridhar & Kaveriappa, 1987). Ainsi, dans des boisements riverains plus ou moins éloignés de la rivière ces champignons peuvent être présents et même sporuler spontanément. Néanmoins les conidies des champignons Ingoldiens présentent une morphologie particulière, favorable à la colonisation des substrats aquatiques. Cette adaptation au milieu aquatique est d'ailleurs l'un des éléments permettant de définir les champignons Ingoldiens (Descals & Chauvet, 1992). La morphologie conidienne la plus caractéristique est le type tétraradié, représenté par le genre *Lemonniera* (p. ex. *L. centrosphaera* Marvanová, planche 1). Le second type le plus fréquent est la forme sigmoïde, illustrée par *Flagellospora curvula* Ingold. Mais les conidies de certaines espèces peuvent être également globuleuses, de forme ramifiée (*Varicosporium giganteum* Crane) ou de morphologie plus variée (*Gyoerffyella gemellipara* Marvanová, planche 1). L'illustration des conidies des espèces du sud-ouest de la France (cf. Chauvet, 1990) suggère que l'identification peut être facilement basée sur la morphologie conidienne. Mais si la distinction de nombreuses espèces est relativement aisée, la détermination de certaines d'entre-elles requière l'isolement en culture pure et l'observation de la conidiogénèse.

Comparées aux spores de forme sphérique ou ovoïde, la plupart des conidies d'hyphomycètes aquatiques sont adaptées à la colonisation, c'est-à-dire à une stabilisation et une germination rapides sur les substrats immergés (Read et al., 1990; Webster, 1959; Webster & Davey, 1984). On a pu montrer en outre que ces conidies étaient préférentiellement piégées dans l'écume qui flotte fréquemment à la surface des cours d'eau (Iqbal & Webster, 1973). Ce phénomène a été mis en évidence chez des espèces aux conidies tétraradiées dont les bras sont probablement attirés vers la surface des micro-bulles de l'écume par des phénomènes de tension superficielle. Cependant l'écume de certaines rivières renferme un faible pourcentage de grandes conidies tétraradiées en comparaison des sporulations observées sur les litières dans le fond de ces rivières (Chauvet, 1992) et présente à l'inverse une proportion élevée de conidies vermiformes ou globuleuses (*Anguillospora crassa* Ingold, *Goniopila monticola* (Dyko) Marvanová et Descals). La morphologie des conidies pourrait expliquer ces différences de piégeage dans l'écume, mais l'origine des spores pourrait également être en cause (p. ex., le bois flottant ou les litières terrestres en bordure de rivière). Ces réserves étant formulées, la récolte d'écume reste une méthode pratique d'échantillonnage des rivières. Il suffit de récolter l'écume à l'aide d'une écumoire, par exemple, et de la fixer avec un mélange d'alcool,

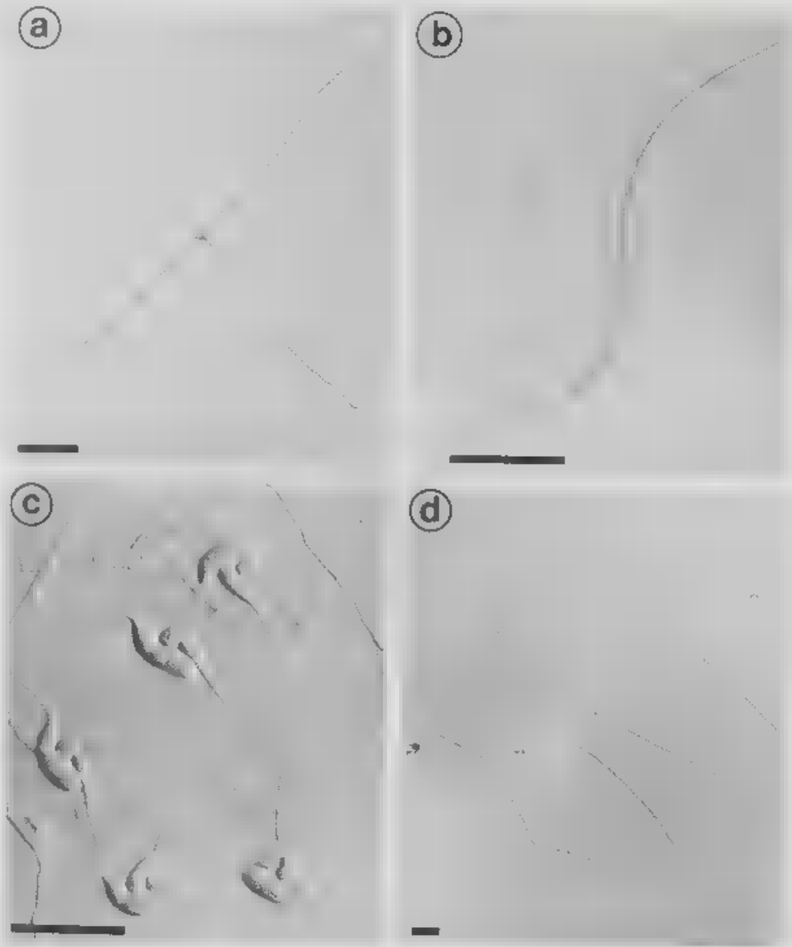


Planche 1 - Conidies d'hyphomycètes aquatiques (microscopie en contraste interférentiel, échelle = 25µm). a: *Lemonniera centrosphaera* (CERR 79.134). b: *Flagellospora curvula* (CERR 30.137). c: *Gyoerffyella gemellipara* (CERR 30.75). d: *Varicosporium giganteum* (CERR 29.81).

Plate 1 - Interference light micrographs of aquatic hyphomycetes conidia (bar = 25µm). a: *Lemonniera centrosphaera* (CERR 79.134). b: *Flagellospora curvula* (CERR 30.137). c: *Gyoerffyella gemellipara* (CERR 30.75). d: *Varicosporium giganteum* (CERR 29.81).

d'acide acétique et de formol (Ingold, 1975) ou de la répartir simplement sur une gélose pour un isolement ultérieur des espèces. Au moyen de cette technique, nous avons pu identifier jusqu'à 59 espèces Ingoldiennes dans l'écume d'une rivière de montagne (Descals & Chauvet, 1992).

Distribution et habitat

L'identification relativement aisée de ces champignons a rendu possible l'inventaire de nombreuses rivières dans différentes parties du monde et, par là même, le développement de certaines notions sur la distribution géographique des espèces. Ces champignons sont répartis dans le monde entier, de nombreuses espèces communes de nos régions étant cosmopolites. D'après Wood-Eggenschwiler & Bärlocher (1985), on peut distinguer trois types d'espèces, selon leur distribution:

1°) des espèces à répartition mondiale, mais plus communes en région tempérée froide comme *Tetracladium marchalianum* Ingold ou en région tropicale comme *Triscelophorus monosporus* Ingold.

2°) des espèces à distribution latitudinale marquée comme *Culicidospora aquatica* Petersen en zone tempérée ou *Flabellospora verticillata* Alasoadura en zone tropicale.

3°) enfin, quelques espèces limitées à leur localité-type. Dans cette catégorie se trouvent également les nombreuses espèces dont la distribution est imparfaitement connue.

L'habitat des hyphomycètes aquatiques sous nos climats correspond typiquement aux rivières forestières, oxygénées, fraîches et oligotrophes. C'est la raison pour laquelle dans le sud-ouest de la France, par exemple, on les trouve davantage en zone montagnarde qu'en région de plaine. Toutefois, ces champignons ont été également signalés dans des milieux aquatiques aussi variés que les lacs, les étangs et les canaux, ainsi que dans les estuaires dont certaines espèces semblent supporter la salinité (Sridhar & Kaveriappa, 1988). Si les hyphomycètes aquatiques affectionnent les rivières oligotrophes, c'est probablement parce qu'une forte augmentation des concentrations en nutriments (nitrate et phosphate) peut favoriser d'autres microorganismes, comme les algues et les bactéries, dominant la compétition avec les hyphomycètes. Nous avons d'ailleurs observé qu'une eutrophisation des cours d'eau s'accompagnait fréquemment d'une diminution du nombre d'espèces d'hyphomycètes.

Sous nos latitudes, la diversité spécifique est maximale pour des températures de cours d'eau voisines de 10-15°C, alors que ces champignons présentent des températures optimales de croissance en culture pure supérieures de 10°C environ. Cette différence est sans doute la conséquence de compétitions intenses dans le milieu naturel; Webster et al. (1976) citent un phénomène similaire pour deux espèces d'hyphomycètes dont la culture mixte présente un optimum abaissé de 15°C par rapport à ceux des cultures pures. Cette capacité des hyphomycètes de se développer à basse température leur permet d'occuper une niche écologique particulière et représente une stratégie d'adaptation. Cet effet de la température est apparu nettement dans une étude sur la distribution des communautés dans le sud-ouest de la France (Chauvet, 1991). Dans une analyse factorielle des correspondances basée sur l'abondance relative des espèces, celles-ci étaient réparties en deux groupes en fonction d'un gradient de la température. Le plus petit de ces groupes renfermait des espèces comme *Lunulospora curvula* Ingold et *Triscelophorus monosporus*, caractéristiques des régions tropicales et apparaissant dans notre région seulement dans les cours d'eau de plaine et au cours de la période la plus chaude de l'année.

D'une façon générale, la qualité de l'eau peut influencer la composition des communautés d'hyphomycètes. Plusieurs travaux tendent à montrer qu'un pH faiblement acide est favorable à une diversité spécifique maximale et que le

nombre d'espèces d'hyphomycètes diminue nettement lorsque le pH des rivières s'élève au-dessus de 7 (Bärlocher, 1987; Wood-Eggenschwiler & Bärlocher, 1983). D'autres facteurs, plus ou moins liés au pH, sont probablement impliqués (alcalinité et teneur en calcium de l'eau, géologie du substrat, nature de la végétation riveraine) sans qu'il soit toujours possible dans les conditions naturelles de déterminer l'influence respective du pH et de chacun de ces facteurs (Suberkropp, 1992a).

Dans la plupart des rivières et à toutes saisons, un inoculum potentiel constitué de quelques conidies d'hyphomycètes est véhiculé par le courant. Dans les heures et les jours qui suivent la chute des litières dans le cours d'eau, ces litières vont être rapidement colonisées. Pour plusieurs espèces, 30 minutes suffisent pour que les conidies commencent à germer (Read et al., 1990). Le mycélium est produit à la surface et à l'intérieur des tissus foliaires et après une à deux semaines environ les premiers conidiophores apparaissent et commencent à libérer les conidies en grand nombre. Pour exemple, une rondelle de feuille de diamètre 1 cm peut porter jusqu'à 100 000 conidies de différentes espèces après deux à trois semaines d'incubation. C'est évidemment à cette période, généralement vers la fin de l'automne, que l'on trouvera le plus de conidies dans la rivière (jusqu'à plusieurs milliers ou dizaines de milliers par litre d'eau). Cette augmentation d'activité forte et extrêmement rapide des hyphomycètes aquatiques est consécutive à l'apport de feuilles mortes. La chronologie de ce cycle est influencée par la phénologie des forêts riveraines et varie donc en fonction de la latitude.

IMPLICATIONS DANS L'ECOLOGIE DES RIVIERES

Si les hyphomycètes occupent une place à part parmi les champignons aquatiques du fait du nombre considérable de travaux qui leur sont consacrés, c'est parce qu'au cours des vingt dernières années l'importance fondamentale de ce groupe de champignons dans le fonctionnement des rivières est devenue de plus en plus évidente.

Dès 1912, Thienemann avait montré l'importance de la matière organique d'origine terrestre dans le fonctionnement des écosystèmes d'eau courante. Plus tard, les travaux de Hynes (1963) et de Minshall (1967, 1968) allaient contribuer à préciser et illustrer ce rôle fondamental. En référence à ces études, de nombreux chercheurs se sont alors engagés à définir la part prise par cette matière organique allochtone dans le bilan énergétique des rivières. Ces études sont généralement limitées aux petits cours d'eau, particulièrement en raison de la difficulté à aborder un système vaste et complexe de grande rivière. On estime qu'en moyenne 500 g m^{-2} de matériel allochtone, dont 70% de feuilles mortes, arrivent annuellement dans les petits cours d'eau forestiers (Bird & Kaushik, 1981). Naturellement cet apport est très variable selon les rivières: en milieu désertique ou prairial, il devient faible voire négligeable en comparaison des sources de matière organique autochtone. On considère par contre que les apports de litière représentent 50 à 90% du bilan énergétique des petits cours d'eau forestiers. Ainsi les rivières de faible dimension apparaissent fondamentalement de nature hétérotrophe, contrairement aux rivières plus importantes qui sont autotrophes. Dans les premières, la production primaire aquatique limitée par l'ombrage des rives est négligeable devant l'importance des apports terrestres; dans les secondes, la largeur du lit augmentant, l'importance de la végétation riveraine comme source d'énergie diminue devant celle de la matière organique autochtone représentée par les algues et les plantes aquatiques

(Cummins, 1979; Fisher & Likens, 1973; Hynes, 1970, 1975). La théorie du continuum fluvial (Vannote et al., 1980) précise que les très grands fleuves peuvent revenir à l'hétérotrophie en raison d'une forte turbidité limitant la production primaire; les sources d'énergie correspondent alors essentiellement aux fines particules de matière organique venant de l'amont. Quelques études prouvent que le rôle des litières dans le fonctionnement des rivières n'est pas seulement alimentaire mais que le bois, les branches, les brindilles et les écorces assurent également la stabilité du lit et des berges et procurent des substrats et des abris pour les invertébrés et les poissons.

Les travaux de Kaushik & Hynes (1971) et de Petersen & Cummins (1974) ont montré que la décomposition des feuilles mortes dans les rivières suit schématiquement trois étapes: (1) une courte période de perte de composés hydrosolubles par lessivage, (2) une phase de colonisation par les bactéries et les champignons conduisant au "conditionnement" des litières, (3) une période de fragmentation et d'assimilation par les invertébrés aquatiques. Les avis divergent quant à l'incidence réelle de ces invertébrés sur la dégradation de la litière immergée. En revanche il est certain que cette matière organique terrestre constitue, sous différentes formes, la base de l'alimentation de la majorité des peuplements d'invertébrés des rivières. Merritt & Cummins (1984) ont ainsi classé les taxons d'insectes aquatiques en groupes fonctionnels, en rapport avec leurs source et mode d'alimentation et l'utilisation des détritus de différentes dimensions. Ces relations sont illustrées dans de multiples travaux (cf. Anderson & Sedell, 1979). La plupart des études soulignent l'importance d'une "préparation" des litières par les microorganismes avant toute colonisation et assimilation par les invertébrés benthiques.

C'est dans ce contexte que les hyphomycètes aquatiques ont reçu l'attention des écologistes en raison de leur rôle déterminant dans le processus de décomposition. En fait, les travaux des vingt dernières années suivent globalement deux grandes orientations correspondant aux deux mécanismes d'intervention de ces champignons: une activité directe transformant les litières en matière organique particulaire, en composés dissous et en CO_2 et une activité indirecte, de "conditionnement" permettant la dégradation des litières par les invertébrés (figure 1). Ceci est évidemment une simplification car les deux processus se superposent généralement et interagissent même très étroitement dans la nature.

Les hyphomycètes aquatiques, en tant que décomposeurs

C'est seulement récemment que les hyphomycètes aquatiques ont été considérés comme des décomposeurs à part entière. En employant les méthodes adéquates on a pu mettre précisément en évidence leur abondance et leur activité sur les litières. Au moyen d'une technique chromatographique, Gessner (1991) a estimé la biomasse des hyphomycètes aquatiques sur les litières par dosage de l'ergostérol, stérol spécifique des champignons. Des teneurs en ergostérol variant entre 3 et 10 mg par g de biomasse fongique ont été relevées à partir de différentes souches d'hyphomycètes cultivées en laboratoire. La combinaison de ces chiffres et des concentrations en ergostérol mesurées sur les litières indique que la biomasse fongique représente jusqu'à 10% de la masse des feuilles mortes en décomposition dans une rivière (Gessner & Schwoerbel, 1991). Une telle importance n'avait encore jamais été démontrée dans les rivières; d'un point de vue strictement pondéral, les hyphomycètes aquatiques représenteraient ainsi le premier groupe associé aux litières, bien avant les

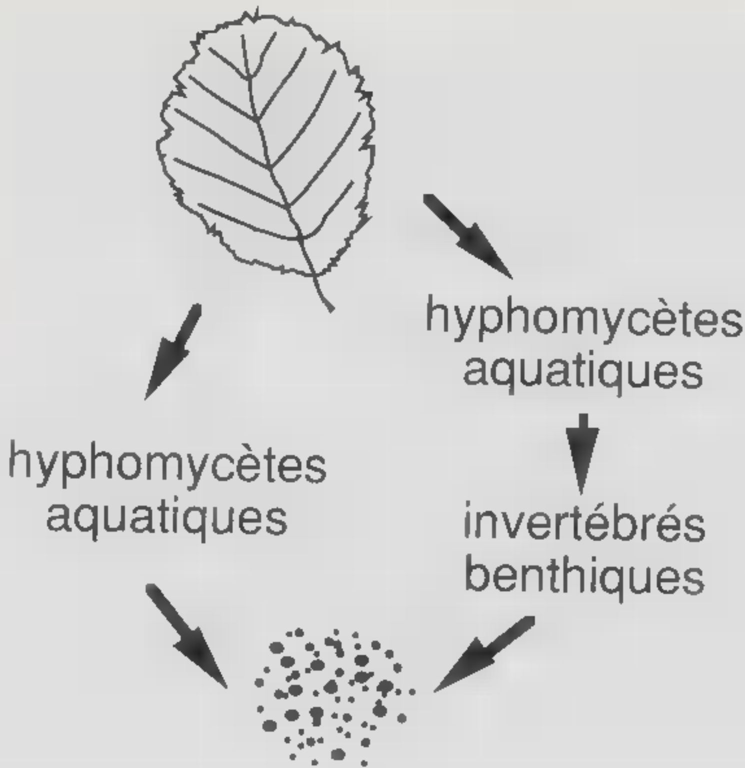


Figure 1 - Modèle simplifié d'intervention des hyphomycètes aquatiques dans la décomposition des litières.

Figure 1 - Simplified model of aquatic hyphomycetes involvement in litter decomposition.

invertébrés aquatiques. Cette importance de la biomasse fongique a d'ailleurs été souvent mise en évidence dans les sols.

En dehors des études montrant l'importance quantitative des hyphomycètes, plusieurs travaux ont été directement consacrés à l'activité enzymatique de ces champignons (cf. Hasija & Singhal, 1991). Le matériel végétal en décomposition dans les milieux aquatiques est caractérisé par différents constituants en proportions variables et présente en particulier un fort pourcentage de deux groupes de polymères réfractaires, la cellulose et la lignine. La décomposition de la cellulose par les hyphomycètes a été largement étudiée. Les enzymes de type endoglucanase ont été détectés à plusieurs reprises chez de nombreuses espèces (tableau 1). La dégradation de différents polysaccharides (xanthane, lichenane, xylane, mannane, mannose, carraghénane, cellobiose) a été signalée chez certaines souches d'hyphomycètes (Suberkropp et al., 1983; Zare-Maivan & Shearer, 1988; Zemek et al., 1985). Quelques travaux, par des méthodes différentes, mettent en évidence une dégradation de la lignine par les hyphomycètes aquatiques. Fisher et al. (1983) ainsi que Zare-Maivan & Shearer (1988) ont montré une déphénolisation partielle de lignines synthétiques par certaines espèces tandis que Zemek et al. (1985) décrivent une activité ligninasique

chez la plupart des hyphomycètes testés. La dégradation de l'acide tannique est l'indice d'une activité polyphénol-oxydasique, responsable de la dégradation de la lignine par ces champignons (Abdullah & Taj-Aldeen, 1989; Zare-Maivan & Shearer, 1988). Les parois cellulaires du matériel végétal sont composées en grande partie de substances pectiques dont la dégradation est responsable de la macération des litières. Les deux enzymes de la pectinolyse mis en évidence chez les hyphomycètes aquatiques sont la pectine-lyase et la polygalacturonase. On a également détecté chez ces champignons une activité dans la dégradation d'autres constituants de la matière végetale: protéines, lipides et amidon (tableau I).

Celluloses, hémicelluloses et polysaccharides: 1, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15.
Lignines et phénols: 1, 7, 14, 15.
Pectines: 2, 3, 4, 6, 10, 12, 13, 14, 15.
Lipides: 1, 14.
Protéines: 1, 12, 14.
Amidon: 1, 6, 14, 15.

1: Abdullah & Taj-Aldeen (1989). 2: Butler & Suberkropp (1986). 3: Chamier & Dixon (1982). 4: Chamier et al. (1984). 5: Chauvet & Mercé (1988). 6: Danninger et al. (1979). 7: Fisher et al. (1983). 8: Jones (1981). 9: Singh (1982). 10: Suberkropp & Klug (1980). 11: Suberkropp & Klug (1981). 12: Suberkropp et al. (1983). 13: Suberkropp & Arsuffi (1984). 14: Zare-Maivan & Shearer (1988). 15: Zemek et al. (1985).

Tableau I - Constituants végétaux dégradés par les hyphomycètes aquatiques, d'après la littérature.

Table I - Plant matter constituents degraded by aquatic hyphomycetes, according to the literature.

Le mécanisme de décomposition des litières sous l'action des hyphomycètes aquatiques a été particulièrement mis en évidence par Suberkropp & Klug (1980). Après quelques semaines de développement du mycélium sur des feuilles mortes, l'activité enzymatique est maximale. Le parenchyme foliaire est alors macéré, ramolli (en particulier sous l'action des pectine-lyases) ce qui entraîne la libération d'une matière organique particulaire fine constituée de cellules végétales, de fragments mycéliens et de spores. A terme, ceci aboutit à la "squelettisation" des feuilles mortes dont les nervures restent peu dégradées. Il semble par ailleurs qu'un pH et une teneur en calcium élevés dans le milieu soient favorables à cette activité enzymatique et à la macération des litières (Chamier & Dixon, 1982; Suberkropp & Klug, 1980). Ainsi l'activité de ces champignons serait plus grande dans les rivières aux eaux alcalines.

Suberkropp (1991) a montré que les taux de sporulation des hyphomycètes aquatiques (*in vitro* sur deux espèces et *in situ* sur les communautés de deux rivières) étaient maximaux après une période d'incubation de 15 à 19 jours. Cette augmentation de la sporulation s'accompagnait corrélativement d'un accroissement de la biomasse et des taux de respiration fongique. Ceci dénote une activité particulièrement rapide de ces champignons dont le cycle sur les litières peut être bouclé en deux à trois semaines seulement.

Les hyphomycètes aquatiques, maillon des réseaux trophiques

En produisant une matière organique en fines particules à partir des litières en décomposition, l'activité des hyphomycètes aquatiques permet l'ali-

mentation des invertébrés collecteurs et collecteurs-filtreurs qui abondent dans le cours moyen des rivières. La théorie du continuum fluvial (Vannote et al., 1980) précise en effet que les communautés d'invertébrés sont organisées et distribuées le long des cours d'eau de façon optimale du point de vue de l'utilisation de l'énergie. C'est ainsi que la partie moyenne des cours d'eau, collectant les nombreuses particules végétales provenant de la décomposition des litières des petites rivières de l'amont, est caractérisée par des peuplements d'invertébrés adaptés à l'assimilation de ces fragments végétaux transformés et enrichis par l'activité microbienne. Ces invertébrés collectant les particules sur le fond de la rivière ou les filtrant dans l'eau au moyen de divers dispositifs dépendent indirectement de l'activité des hyphomycètes aquatiques.

Mais c'est davantage à l'effet de conditionnement avant une assimilation par les invertébrés dilacérateurs que les écologistes font référence en plaçant les hyphomycètes aquatiques comme des "intermédiaires" dans les flux d'énergie dans les rivières (Bärlocher & Kendrick, 1976). Nous savons que l'apport de litière est maximal dans la partie amont des réseaux hydrographiques. Dans ces petits cours d'eau, les communautés d'invertébrés sont dominées par les dilacérateurs qui ont la capacité de découper, déchiqueter, broyer les litières et peuvent assimiler de grands fragments végétaux. Au cours des premiers jours et des toutes premières semaines de la décomposition, quand les litières ne sont pas encore désintégrées mais que la biomasse fongique est bien développée, les invertébrés dilacérateurs ont une activité maximale sur les feuilles mortes. De nombreuses expériences ont montré que ces invertébrés préféraient les feuilles conditionnées par les champignons à des feuilles non colonisées. On a même décelé une préférence des gammares et des trichoptères pour certaines espèces fongiques (Bärlocher & Kendrick, 1973; Butler & Suberkropp, 1986; Suberkropp et al., 1983). Des expériences montrent que ceux-ci sont capables de choisir et de se nourrir sélectivement sur les parties de la feuille colonisées par telle ou telle espèce fongique. En modifiant la qualité alimentaire des litières, les hyphomycètes aquatiques peuvent en outre affecter les taux de croissance des invertébrés. On constate généralement que le mycélium de ces champignons est assimilé plus efficacement que la litière non conditionnée et que les taux d'assimilation varient selon les espèces d'hyphomycètes. Cependant, si la biomasse fongique contribue directement à la nutrition des invertébrés dilacérateurs, sa part précise dans leur alimentation reste difficilement appréciable (Suberkropp, 1992b). En consommant les litières, les invertébrés peuvent en retour contrôler le développement des hyphomycètes et les relations existant entre les deux groupes d'organismes s'apparentent alors à des phénomènes de compétition (Bärlocher, 1980).

Ainsi, la colonisation fongique provoque non seulement la dégradation des polymères réfractaires et leur transformation en unités plus petites, mieux assimilables, mais elle permet aussi d'associer aux litières une quantité de protéines fongiques (et donc d'azote) très intéressante pour le métabolisme des invertébrés aquatiques. Les hyphomycètes aquatiques constituent le maillon indispensable entre, d'une part, l'apport de litière qui constitue la source principale d'énergie pour la rivière et, d'autre part, les invertébrés aquatiques et avec eux tout le reste de la chaine alimentaire. Ainsi cette fonction d'intermédiaire des hyphomycètes aquatiques apparaît essentielle au recyclage des éléments et au métabolisme général de l'écosystème.

RÉFÉRENCES

ABDULLAH S.K. and TAJ-ALDEEN S.J. , 1989 - Extracellular enzymatic activity of aquatic and aero-aquatic conidial fungi. *Hydrobiologia* 174: 217-223.

ABDULLAH S.K., DESCALS E. and WEBSTER J., 1981 - Teleomorphs of three aquatic Hyphomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 77: 475-483.

ANDERSON N.H. and SEDELL J.R., 1979 - Detritus processing by macroinvertebrates in stream ecosystems. *Ann. Rev. Entomol.* 24: 351-377.

BANDONI R.J., 1981 - Aquatic hyphomycetes from terrestrial litter. *In* D.T. Wicklow & G.C. Carrol, *The fungal community: its organization and role in the ecosystem.* New York, M. Dekker: 693-708.

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1973 - Fungi and food preferences of *Gammarus pseudolimnaeus*. *Arch. Hydrobiol.* 72: 501-516.

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1974 - Dynamics of the fungal populations on leaves in a stream. *J. Ecol.* 62: 761-791.

BÄRLOCHER F. and KENDRICK B., 1976 - Hyphomycetes as intermediaries of energy flow in streams. *In* E.B.G. Jones, *Recent advances in aquatic mycology*. London, Elek: 435-446.

BÄRLOCHER F., 1980 - Leaf-eating invertebrates as competitors of aquatic hyphomycetes. *Oecologia* 47: 303-306.

BÄRLOCHER F., 1982 - On the ecology of Ingoldian fungi. *BioScience* 32: 581-586.

BÄRLOCHER F., 1987 - Aquatic hyphomycete spora in 10 streams in New Brunswick and Nova Scotia. *Canad. J. Bot.* 65: 76-79.

BIRD G.A. and KAUSHIK N.K., 1981 - Coarse particulate organic matter in streams. *In* Lock M.A. & D.D. Williams, *Perspectives in running water ecology*. New-York, Plenum Press: 41-68.

BUTLER S.K. and SUBERKROPP K., 1986 - Aquatic hyphomycetes on oak leaves: comparison of growth, degradation and palatability. *Mycologia* 78: 922-928.

CHAMIER A.-C. and DIXON P.A., 1982 - Pectinases in leaf degradation by aquatic hyphomycetes: the enzymes and leaf maceration. *J. Gen. Microbiol.* 128: 2469-2483.

CHAMIER A.-C. , DIXON P.A. and ARCHER S.A., 1984 - The spatial distribution of fungi on decomposing alder leaves in a freshwater stream. *Oecologia* 64: 92-103.

CHAUVET E. et MERCÉ J., 1988 - Hyphomycètes aquatiques: importance dans la décomposition des litières. *Rev. Sci. Eau* 1: 203-216.

CHAUVET E., 1990 - Hyphomycètes aquatiques du sud-ouest de la France. *Gaussenia* 6: 3-31.

CHAUVET E., 1991 - Aquatic hyphomycete distribution in South-Western France. *J. Biogeogr.* 18: 699-706.

CHAUVET E., 1992 - Dynamique saisonnière des spores d'hyphomycètes aquatiques de quatre rivières. *Nova Hedwigia* 54: 379-395.

CUMMINS K.W., 1979 - The natural stream ecosystem. *In* Ward J.V. & J.A. Stanford, *The ecology of regulated streams*. New York, Plenum Press: 7-24.

DANNINGER E., MESSNER K. und ROHR M., 1979 - Untersuchungen über den biologischen Abbau organischer naturstoffe durch aquatische hyphomyzeten. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B* 169: 282-286.

DESCALS E. et CHAUVET E., 1992 - Diversité des champignons Ingoldiens de quelques rivières du sud-ouest de la France. *Nova Hedwigia* 54: 83-96.

FISHER P.J., DAVEY R.A. and WEBSTER J. , 1983 - Degradation of lignin by aquatic and aero-aquatic Hyphomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 80: 166-168.

FISHER S.G. and LIKENS G.E., 1973 - Energy flow in Bear Brook, New Hampshire: an interactive approach to stream ecosystem metabolism. *Ecol. Monogr.* 43: 421-439.

GESSNER M.O, 1991 - Differences in processing dynamics of fresh and dried leaf litter in a stream ecosystem. *Freshwat. Biol.* 26: 387-398.

GESSNER M.O. and SCHWOERBEL J. , 1991 - Fungal biomass associated with decaying leaf litter in a stream. *Oecologia* 87: 602-603.

HASIJA S.K. and SINGHAL P.K., 1991 - Degradation of plant litter by aquatic hyphomycetes. *In:* Arora D.K., Rai B., Mukerji K.G. & Knudsen G.R., *Handbook of Applied Mycology.* New-York, M. Dekker: 491-505.

HYNES H.B.N., 1963 - Imported organic matter and secondary productivity in streams. *Proc. 16th Int. Congr. Zool.* 3: 324-329.

HYNES H.B.N., 1970 - *The ecology of running waters.* Toronto, Univ. Toronto Press, 555 p.

HYNES H.B.N., 1975 - The stream and its valley. *Verh. Int. Ver. Limnol.* 19: 1687-1692.

INGOLD C.T., 1942 - Aquatic hyphomycetes of decaying alder leaves. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 25: 339-415.

INGOLD C.T., 1975 - *An Illustrated Guide to Aquatic and Water-borne Hyphomycetes (Fungi Imperfecti) with Notes on their Biology.* Sci. Publ. No. 30, Freshwater Biological Association, 96 p.

IQBAL S.H. and WEBSTER J., 1973 - The trapping of aquatic hyphomycete spores by air bubbles. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 60: 37-48.

JONES E.B.G., 1981 - Observations on the ecology of lignicolous aquatic hyphomycetes. *In:* D.T. Wicklow & G.C. Carroll, *The fungal Community: Its Organization and Role in the Ecosystem.* New-York, M. Dekker: 731-742.

KAUSHIK N.K. and HYNES H.B.N., 1968 - Experimental study on the role of autumn-shed leaves in aquatic environments. *J. Ecol.* 56: 229-243.

KAUSHIK N.K. and HYNES H.B.N., 1971 - The fate of the dead leaves that fall into streams. *Arch. Hydrobiol.* 68: 465-515.

MERRITT R.W. and CUMMINS K.W., 1984 - *An introduction to the aquatic insects of North America.* 2nd ed., Dubuque, Iowa, Kendall/Hunt Publishing Company, 722p.

MINSHALL G.W., 1967 - Role of allochthonous detritus in the trophic structure of a woodland springbrook community. *Ecology* 48: 139-149.

MINSHALL G.W., 1968 - Community dynamics of the benthic fauna in a woodland springbrook. *Hydrobiologia* 32: 305-339.

PETERSEN R.C. and CUMMINS K.W., 1974 - Leaf processing in a woodland stream. *Freshwat. Biol.* 4: 343-368.

READ S.J., MOSS S.T. and JONES E.B.G, 1990 - Attachment and germination of aquatic hyphomycete conidia. *4th Internat. Mycol. Cong.*, 28 Aug.-3 Sept., Regensburg, Germany.

SINGH N., 1982 - Cellulose decomposition by some tropical aquatic hyphomycetes. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 79: 560-561.

SRIDHAR K.R. and KAVERIAPPA K.M., 1987 - Occurrence and survival of aquatic hyphomycetes under terrestrial conditions. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 89: 606-609.

SRIDHAR K.R. and KAVERIAPPA K.M., 1988 - Occurrence and survival of aquatic hyphomycetes in brackish and sea water. *Arch Hydrobiol.* 113: 153-160.

SUBERKROPP K. and KLUG M.L., 1976 - Fungi and bacteria associated with leaves during processing in a woodland stream. *Ecology* 57: 707-719.

SUBERKROPP K. and KLUG M.L., 1980 - The maceration of deciduous leaf litter by aquatic hyphomycetes. *Canad. J. Bot.* 58: 1025-1031.

SUBERKROPP K. and KLUG M.L., 1981 - Degradation of leaf litter by aquatic hyphomycetes. *In* : D.T. Wicklow & G.C. Carrol, *The fungal community: its organization and role in the ecosystem.* New York, M. Dekker: 761-775.

SUBERKROPP K., ARSUFFI T.L. and ANDERSON J.P., 1983 - Comparison of degradative ability, enzymatic activity, and palatability of aquatic hyphomycetes grown on leaf litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 237-244.

SUBERKROPP K. and ARSUFFI T.L., 1984 - Degradation, growth, and changes in palatability of leaves colonized by six aquatic hyphomycete species. *Mycologia* 76: 398-407.

SUBERKROPP K., 1991 - Relationships between growth and sporulation of aquatic hyphomycetes on decomposing leaf litter. *Mycol. Res.* 95: 843-850.

SUBERKROPP K., 1992a - Aquatic hyphomycete communities. *In* : G.C. Carrol & D.T. Wicklow, *The fungal community: its organization and role in the ecosystem.* New York, M. Dekker (sous presse).

SUBERKROPP K., 1992b - Interactions with invertebrates. *In* : F. Barlocher, *The ecology of aquatic hyphomycetes.* Ecological studies series, Springer Verlag (sous presse).

THIENEMANN A., 1912 - Der Bergbach des Sauerlandes. Int. Rev. Ges. Hydr. Suppl. 4: 1-125.

TRISKA F.J., 1970 - Seasonal distribution of aquatic hyphomycetes in relation to the disappearance of leaf litter from a woodland stream. Ph. D. Thesis, Univ. of Pittsburgh, Pennsylvania, 189 p.

VANNOTE R.J., MINSHALL G.W., CUMMINS K.W., SEDELL J.R. and CUSHING C.E., 1980 - The river continuum concept. *Canad. J. Fish. Aquat. Sci.* 37: 130-137.

WEBSTER J., 1959 - Experiments with spores of aquatic hyphomycetes I. Sedimentation and impaction on smooth surfaces. *Annals Bot.* 23: 595-610.

WEBSTER J., MORAN S.T. and DAVEY R.A., 1976 - Growth and sporulation of *Tricladium chaetocladium* and *Lunulospora curvula* in relation to temperature. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 67: 491-549.

WEBSTER J. and DESCALS E., 1979 - The teleomorphs of water-borne hyphomycetes from fresh water. *In* : W.B. Kendrick, *The whole fungus.* Ottawa, Nat. Mus. Canada: 419-451.

WEBSTER J. and DESCALS E., 1981 - Morphology, distribution, and ecology of conidial fungi in freshwater habitats. *In* : Cole G.C. & Kendrick B., *Biology of the Conidial Fungi:* 1. Academic Press, Inc.: 295-355.

WEBSTER J. and DAVEY R.A., 1984 - Sigmoid conidial shape in aquatic fungi. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 83: 43-52.

WEBSTER J., SCHEUER CH. and OM-KALTHOUM KHATTAB S., 1991 - *Hydrocina chaetocladia* gen. et sp. nov., the teleomorph of *Tricladium chaetocladium*. *Nova Hedwigia* 52: 65-72.

WOOD-EGGENSCHWILER S. and BÄRLOCHER F., 1983 - Aquatic hyphomycetes in sixteen streams in France, Germany and Switzerland. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 81: 371-379.

WOOD-EGGENSCHWILER S. and BÄRLOCHER F., 1985 - Geographical distribution of Ingoldian fungi. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 22: 2780-2785.

ZARE-MAIVAN H. and SHEARER C.A., 1988 - Extracellular enzyme production and cell wall degradation by freshwater lignicolous fungi. *Mycologia* 80: 365-375.

ZEMEK J., MARVANOVA L., KUNIAK L. and KADLECIKOVA B., 1985 - Hydrolytic enzymes in aquatic Hyphomycetes. *Folia Microbiol.* 30: 363-372.

DIVERSITÉ ULTRASTRUCTURALE DE LA PAROI ASCOSPORALE CHEZ QUELQUES EUPYRÉNOMYCÈTES

A. BELLEMÈRE[1], M.C. JANEX-FAVRE[2], L.M. MELENDEZ-HOWELL[3] et A. PARGUEY-LEDUC[2]

(1) 53 Jardins Boieldieu, 92800 Puteaux.
(2) Laboratoire de Cryptogamie, Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), Boite 33, 7 Quai Saint-Bernard 75252 Paris Cedex 05.
(3) C.N.R.S. - Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle, 12 rue Buffon - 75005 Paris.

RÉSUMÉ - Le développement de la paroi ascosporale est examiné en microscopie électronique chez des Eupyrénomycètes à ascospores lisses, ornementées ou pourvues d'appendices, appartenant à divers ordres: Diaporthales (Melanconidaceae: *Hercospora*; Valsaceae: *Diaporthe, Gnomonia, Leucostoma*; *inc. sedis: Caudospora*); Diatrypales (Diatrypaceae: *Diatrype, Diatrypella*); Sordariales (Coniochaetaceae: *Coniochaeta*; Lasiosphaeriaceae: *Apiosordaria, Lacunospora, Podospora*; Sordariaceae: *Gelasinospora, Neurospora, Sordaria*) et une Xylariale (Xylariaceae: *Hypoxylon*). Bien que se rattachant à un même plan structural, la paroi ascosporale présente des variantes (différences de développement et de structure de certaines couches) qui peuvent parfois aboutir à des convergences (forte épaisseur de la paroi, réalisation d'une ornementation). La valeur de la structure de la paroi ascosporale, en tant que critère systématique, est discutée.

ABSTRACT - Ultrastructural wall development in smooth, ornamented or appendage-bearing ascospores is studied in some Eupyrenomycetes related to different orders: Diaporthales (Melanconidaceae: *Hercospora*; Valsaceae: *Diaporthe, Gnomonia, Leucostoma*; *inc. sedis: Caudospora*); Diatrypales (Diatrypaceae: *Diatrype, Diatrypella*); Sordariales (Coniochaetaceae: *Coniochaeta*; Lasiosphaeriaceae: *Apiosordaria, Lacunospora, Podospora*; Sordariaceae: *Gelasinospora, Neurospora, Sordaria*) and one Xylariale (Xylariaceae: *Hypoxylon*). Diversity in the ascospore wall edification appears as variations of a common structural pattern. It depends on differences in development and structural constitution of several layers. Convergences exist relative to wall thickness and ornamentation. The value of ascospore wall structure as systematic criterion is discussed.

MOTS CLÉS : Eupyrénomycètes, ascospores, paroi, ultrastructure.

Les Eupyrénomycètes constituent un vaste groupe d'Ascomycètes (environ 10 ordres et 20 familles) caractérisés: 1. par des fructifications à asques (= ascomas = ascocarpes) comportant des ascothécies (Chadefaud, 1944, 1960; Parguey-Leduc, 1967a et b) incluses dans un stroma ou dans une mince enveloppe stromatique; 2. par des asques toujours unituniqués. Dans ce groupe, l'étude fine de la structure de la paroi ascosporale a, jusqu'à présent, été effectuée très inégalement selon les ordres et le plus souvent sans que des vues synthétiques aient été dégagées. Des données nouvelles ou complémentaires sont apportées ici chez plusieurs genres appartenant à quatre ordres (Diaporthales,

Diatrypales, Sordariales et Xylariales) et quelques idées d'ensemble concernant la structure fine de la paroi ascosporale sont dégagées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Ce travail a été effectué à partir d'échantillons récoltés dans la nature ou obtenus en culture. Les espèces étudiées* sont les suivantes:

Apiosordaria verruculosa (Jensen) Von Arx et Gams, espèce type du genre (Lasiosphaeriaceae). Souche LCP (mycothèque MNHN Paris) n° 2403

Caulospora taleola (Fr.) Starbäck, espèce type du genre (Diaporthales *inc. sed.*). Sur brindilles de *Quercus* (Normandie)

Coniochaeta ligniaria (Grev.) Cooke, espèce type du genre (Coniochaetaceae). Sur crottes (provenances diverses)

Diaporthe oncostoma (Duby) Fuck. (Valsaceae). Sur *Robinia* (Franche-Comté)

Diatrype disciformis (Hoffm.: Fr.) Fries, espèce type du genre (Diatrypaceae). Sur *Fagus* (Alpes)

Diatrypella quercina (Pers.: Fr.) Cooke (Diatrypaceae). Sur *Quercus* (Charentes)

Gelasinospora santiflorii Cailleux (Sordariaceae). Souche LCP n° 2391

Gelasinospora tetrasperma Dowding (Sordariaceae). Souche LCP n° 2319

Gnomonia leptostyla (Fr.) Ces. et de Not. (Valsaceae). Sur *Juglans* (Charentes), mis en culture au Laboratoire de Cryptogamie de Toulouse

Hercospora tiliae (Pers.: Fr.) Tul., espèce type du genre (Melanconidaceae). Sur *Tilia* (Ile-de-France)

Hypoxylon fragiforme (Pers. ex Fr.) Kickx (Xylariaceae). Sur *Corylus* (Alpes)

Lacunospora stercoraria Cailleux, espèce type du genre (Lasiosphaeriaceae). Souche LCP n° 2401

Leucostoma nivea (Pers.: Fr.) von Hohnel (Valsaceae). Sur *Populus nigra* (Alpes)

Neurospora crassa Shear et Dodge (Sordariaceae). Souche LCP n° 251

Podospora anserina (Ces.) Niessl. (Lasiosphaeriaceae). Souche LCP n° 2426 et sur crottes d'âne (Alpes)

Sordaria fimicola (Rob.) Ces. et de Not., espèce type du genre (Sordariaceae). Souche LCP n° 1126

Sordaria prolifica Cailleux (Sordariaceae). Souche LCP n° 2353

Pour les études en microscopie électronique par transmission, des fragments d'hyménium ont été traités par les méthodes classiques: double fixation par le glutaraldéhyde à 6% et le tétroxyde d'osmium à 2%, avec tampon de Sörensen, inclusion dans la résine de Spurr (1969). Les coupes effectuées à l'aide d'un ultra microtome Reichert OMU 3, ont été contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (18 minutes) ou traitées par la technique de Thiéry (= réaction Patag, 1967). Les observations en microscopie électronique

* Les données systématiques suivent Eriksson & Hawksworth (1991).

ont été faites à l'aide d'un microscope Philips 30.15 ou d'un Jeol JM 7, sous tension de 80 KV.

RÉSULTATS

On sait que, d'une façon générale, la paroi ascosporale se développe entre les deux feuillets de la vésicule ascale; d'abord très mince (stade primordial), elle s'épaissit progressivement tout en restant homogène (stade primaire), puis ultérieurement elle se subdivise (stade secondaire) et sa structure se complique. En raison de l'hétérogénéité de la terminologie utilisée par les auteurs, l'exposé des faits devient alors délicat. Ayant employé nous-mêmes certains termes différents dans nos publications antérieures, nous proposons ici un schéma (fig. 1) faisant apparaître les équivalences de terminologie, en vue de faciliter la compréhension de l'exposé. Celui-ci concernera d'abord les genres où la structure de la paroi ascosporale est la plus simple, non ornementée à périspore développée, puis on envisagera ensuite des structures plus complexes: paroi non ornementée pourvue d'une endospore, puis paroi ornementée, avec ornementation d'origine diverse; le cas des ascospores à appendices sera enfin abordé.

I - Paroi ascosporale non ornementée à périspore développée

Ce type de paroi a été observé chez des Diatrypales et des Diaporthales.

Chez les Diatrypales *Diatrype disciformis* et *Diatrypella quercina* la première couche différenciée est la périspore (fig. 2 et 3), résultant de l'épaississement de la paroi primaire par écartement de son feuillet externe, qui devient l'ectospore; l'épaisseur de la périspore est irrégulière et sa surface présente, en coupe, des ondulations d'ampleur variable. Alors que la paroi primaire est transparente aux électrons, la périspore contient, dès sa formation, un réseau plus ou moins lâche de fibrilles contrastées et réactives au test de Thiéry, donc de nature polysaccharidique. Au stade adulte (fig. 4 et 5), la périspore s'est fortement épaissie et l'ectospore limitante n'est plus sinueuse. Une nouvelle couche, l'épispore, s'est différenciée à la base de la périspore: elle est peu épaisse, régulière et opaque aux électrons. Ces trois couches ont le même aspect chez *Quaternaria* (= *Eutypella*) *quaternata* (Griffiths, 1973).

De légères variantes de la structure simple décrite ci-dessus ont été rencontrées chez des Diaporthales. Chez la Melanconidacée *Hercospora tiliae* (fig. 6) la périspore est moins volumineuse et l'ectospore très contournée, tandis que l'épispore est relativement épaisse. Chez la Valsacée *Diaporthe oncostoma* (fig. 7) la périspore est encore plus réduite, voire même interrompue par endroits, et corrélativement l'épispore, relativement claire, devient prépondérante. Chez *Diaporthe eres*, il semble, d'après un cliché de Griffiths (1973) montrant seulement un fragment d'ascospore, qu'une couche supplémentaire existe sous la périspore, qui est irrégulière et contient un réseau fibrilleux. Chez une autre Valsacée, *Leucostoma nivea* (fig. 8), la périspore, contrairement à celle des cas précédents, ne contient pas de réseau polysaccharidique et l'épispore, réactive et peu épaisse, est particulièrement sinueuse; lorsque les ascospores sont très proches les unes des autres dans l'asque leurs périspores confluent entre elles.

II - Paroi ascosporale non ornementée pourvue d'une endospore

Ce type de paroi ascosporale a été observé chez quelques Sordariales. Avant de le décrire il est nécessaire de préciser la notion d'endospore.

a) l'endospore n'est pas une différenciation tardive de la partie basilaire de la paroi propre (= épispore, souvent appelée "primary wall" par les auteurs anglo-saxons, même dans des ascospores âgées).

b) le matériel de l'endospore, produit par le plasmalemme, se dépose entre celui-ci et la paroi propre. Il résulte d'une modification brutale du matériel synthétisé dans la phase précédente ou représente un matériel nouveau, produit après une interruption dans le fonctionnement du plasmalemme. Par suite, il y a toujours un net hiatus fonctionnel ou structural, et de ce fait une limite nettement tranchée, entre la paroi propre et l'endospore. Initialement homogène et transparente aux électrons, celle-ci peut subir ensuite une différenciation, souvent brutale, qui entraîne sa subdivision en deux parties superposées, l'une profonde, reposant sur le plasmalemme, récente et indifférenciée et l'autre externe, nettement différenciée.

A. Genre *Sordaria* (Sordariaceae)

Dans ce genre les ascospores unicellulaires, sombres, ont une paroi lisse et sont pourvues d'un pore germinatif postérieur. Chez *S. fimicola* et chez une espèce voisine *S. prolifica* la paroi de la jeune ascospore (fig. 9 et 12) comporte une paroi propre transparente aux électrons et une périspore plus réactive, dont la limitante externe est faiblement sinueuse. La périspore est finement granuleuse chez *S. fimicola* et plus hétérogène chez *S. prolifica*, où sa base forme au contact de la paroi propre une mince couche plus réactive.

Un peu plus tard (fig. 10) la paroi ascosporale est plus complexe. A sa surface la périspore comporte une nouvelle couche, externe, réduite à des îlots. La paroi propre est également subdivisée et l'endospore commence à s'ébaucher dans l'espace périplasmique. Quand l'ascospore est plus âgée (fig. 11 et 13), la périspore externe, érodée, n'est plus distincte et l'endospore, plus importante, comprend deux parties dont l'externe seule est réactive.

Cette endospore n'a pas été observée chez *S. fimicola* par Furtado & Olive (1970) qui n'ont étudié que des ascospores jeunes, mais elle est figurée avec la dénomination de "primary wall" par Mainwaring (1972); chez *S. brevicollis* les deux couches de l'endospore sont visibles mais ne sont pas interprétées comme telles par Hackett & Chen (1976).

B. Genre *Podospora* (Lasiosphaeriaceae)

Dans ce genre les ascospores adultes sont bicellulaires, comportant typiquement une volumineuse cellule apicale à paroi lisse et brune, pourvue d'un pore germinatif et une petite cellule basale lisse et hyaline (= appendice primaire). Le *P. anserina* étudié ici possède des appendices secondaires gélatineux qui seront examinés plus loin.

A un stade proche de la maturation la paroi ascosporale de la cellule sombre de *P. anserina* comprend (fig. 14) une périspore, une paroi propre et une endospore d'importance équivalente. La périspore, assez claire, renferme de très nombreuses fibrilles courtes, plus ou moins réactives et en majorité disposées sub-tangentiellement. La paroi propre comporte deux couches: l'externe claire et finement granuleuse, l'interne plus épaisse et fortement réactive. L'endospore est aussi formée de deux couches; l'externe est hétérogène (texture

de fond très fine et plages plus claires contenant des granules réactifs) et l'interne, moins épaisse et dépourvue de granules, présente à la base une mince couche réactive.

Dans l'ascospore plus âgée (fig. 15) la périspore est en partie érodée tandis que sa couche basilaire s'est développée. A la maturité de l'ascospore (fig. 16) la périspore est encore plus réduite; une délimitation très nette s'établit entre les deux couches de l'endospore, dont la plus interne peut prendre un développement considérable (fig. 17).

L'architecture de la paroi observée ici chez *P. anserina* est conforme à celle figurée par Beckett et al. (1968) mais notre interprétation diffère puisque ces auteurs considèrent l'endospore comme le "primary wall" et la paroi propre comme le "tertiary wall", la périspore correspondant au "secondary wall".

C. Genre *Coniochaeta* (Coniochaetaceae)

Dans ce genre les ascospores sont unicellulaires, sombres et pourvues d'une fente germinative; elles n'ont pas été étudiées jusqu'à présent en microscopie électronique.

Chez *C. ligniaria* la paroi ascosporale relativement jeune (fig. 18) comporte une épispore mince et régulière, opaque, une volumineuse périspore, d'épaisseur très irrégulière et contenant des fibrilles peu contrastées, sans orientation privilégiée. L'ectospore, habituellement régulière, devient sinueuse lorsqu'elle entre en contact avec la paroi de l'asque ou celle d'une autre ascospore. L'espace périplasmique, clair, est encore bien visible entre le plasmalemme et l'épispore. Ultérieurement du matériel pariétal s'y accumule, formant une endospore. Au stade adulte (fig. 19) celle-ci est importante, régulière, opaque et probablement très dure, car elle est difficile à obtenir intacte sur les coupes; l'épispore, toujours opaque, s'est épaissie tandis que la périspore a régressé.

Le *C. ligniaria* présente donc une paroi ascosporale d'un type analogue à celle des *Sordaria* et *Podospora*, mais l'endospore y est formée d'une seule couche.

III - Paroi ascosporale ornementée

L'ornementation de la paroi ascosporale tire son origine soit de la périspore, soit de l'exospore.

A. Ornementation d'origine périsporale

1. Genre *Hypoxylon* (Xylariaceae, Xylariales)

Les ascospores, uni- ou bicellulaires, claires ou sombres, possèdent une fente germinative. Leur paroi présente une grande diversité, ce qui a conduit Rogers (1979) à distinguer les types suivants: - lisse chez *H. rubiginosum* (bien que Greenhalgh & Evans, 1968, aient observé chez cette espèce, en microscopie à balayage, des rides transversales peu saillantes); - ponctuée ou réticulée chez des *Hypoxylon* à paroi claire; - striée longitudinalement chez *H. weldenii* et *H. chestersii*; - gélifiée chez *H. terricola*. L'espèce étudiée ici, *H. fragiforme*, a des ascospores unicellulaires sombres et ornementées.

La paroi d'une jeune ascospore (fig. 21) est une paroi primaire épaissie irrégulièrement en une périspore, à contenu peu contrasté, limitée par une ectospore nettement réactive. Quand l'ascospore est un peu plus âgée (fig. 22), la

périspore, plus épaisse, présente des boursouflures; dans son contenu finement fibrilleux s'accumule un matériel fortement opaque, sous forme de plaques disposées à une même distance du plasmalemme; par suite la périspore est subdivisée en deux parties. La partie interne est régulière et la partie externe, au-delà des plaques, discontinue. L'ectospore, appliquée alternativement sur les plaques et sur la périspore externe est de ce fait fortement sinueuse. Ultérieurement (fig. 23), les plaques confluent et leurs marges s'infiltrent dans la périspore, constituant l'ébauche de l'ornementation qui, sur les coupes, forme des festons irréguliers.

A un stade plus âgé (fig. 24) les bases des festons tendent à se rejoindre: l'ornementation de la paroi est alors constituée par une couche épaisse réactive contenant des masses oculiformes plus claires réparties irrégulièrement. Elle est recouverte par la mince couche externe claire de la périspore, limitée extérieurement par l'ectospore. Sous la périspore deux nouvelles couches, l'épispore et l'endospore, se sont mises en place, contribuant à l'épaississement de la paroi ascosporale. La première est mince et sombre, à texture finement granuleuse. La seconde, au-dessous, est beaucoup plus épaisse et subdivisée en une partie supérieure claire et une partie inférieure sombre, séparées par une couche de granules très réactifs de taille irrégulière.

Ce mode de formation de l'ornementation de *H. fragiforme* diffère quelque peu de celui observé chez la même espèce par Greenhalgh & Evans (1968) dont les clichés montrent la présence, dans la périspore externe, de nodules granuleux, puis de fibrilles qui englobent ceux-ci et sont orientées plus ou moins perpendiculairement à l'ectospore. Chez une autre espèce, *H. gillesii*, l'ornementation de la paroi ascosporale est du même type (Rogers & Candoussau, 1982); au stade terminal elle devient superficielle par disparition de la périspore et de l'ectospore, ce qui concorde avec la présence, observée en microscopie à balayage, de bourrelets disposés transversalement et parfois anastomosés en réseau autour de l'ascospore.

2. Genre *Gnomonia* (Valsaceae, Diaporthales)

Dans ce genre les ascospores sont hyalines, généralement bicellulaires et parfois pluricellulaires; elles n'ont pas été étudiées jusqu'à présent en microscopie électronique.

Chez *G. leptostyla* la paroi de l'ascospore presque mûre, bien que peu épaisse, comporte plusieurs couches. De l'intérieur vers l'extérieur on observe (fig. 20): une endospore assez épaisse, formée de mèches radiales; une épispore plus mince et fortement opaque, à laquelle se rattachent les mèches; une périspore complexe comportant dans sa partie moyenne des plaques sombres qui tendent à confluer et qui sont comparables à celles observées chez *Hypoxylon fragiforme* (fig. 22); enfin, une ectospore relativement épaisse, sinueuse du fait des boursouflures de la périspore.

3. Genre *Apiosordaria* (Lasiosphaeriaceae, Sordariales)

Chez *A. verruculosa*, espèce étudiée ici, les asques ne renferment que quatre ascospores; celles-ci, bicellulaires, ont une cellule supérieure sombre, à paroi verruqueuse, pourvue d'un pore germinatif apical, et une cellule inférieure plus petite, sub-conique, hyaline ou brun clair.

Dans la paroi de la cellule supérieure de l'ascospore assez jeune on reconnaît (fig. 25), sous une mince limitante externe très sinueuse, une périspore comprenant deux parties, l'externe transparente et l'interne fortement opaque. Cette dernière, d'épaisseur très inégale, est tantôt très développée au point

d'interrompre la partie externe de la périspore et tantôt réduite à une mince couche de granules réactifs.

La paroi propre, mince et transparente, s'individualise au début de la maturation des ascospores (fig. 26). Au-dessus, la périspore interne sombre comporte alors une partie basale continue et une partie supérieure festonnée. La périspore externe, plus claire, montre en partie entre les festons des aspects en guirlande.

Quand l'ascospore est proche de la maturité (fig. 27), la périspore présente une épaisseur régulière. Dans sa partie interne la base, distendue en raison de l'accroissement de la surface ascosporale, est réduite à une mince pellicule appliquée sur la paroi propre. Au-dessus, les festons de la périspore interne forment maintenant des piliers à sommet aplati et développés vers l'extérieur jusqu'à la limitante externe; entre les piliers demeurent des plages de périspore externe, à structure vacuolaire.

En conclusion, l'ornementation des ascospores d'*A. verruculosa*, comme celles d'*Hypoxylon fragiforme* et de *Gnomonia leptostyla*, provient de la persistance d'éléments de la périspore interne.

4. Le genre *Lacunospora* (Lasiosphaeriaceae, Sordariales)

Le genre *Lacunospora* (Cailleux, 1968) présente des ascospores bicellulaires comportant une cellule inférieure courte, hyaline ou d'un brun très clair, et une cellule supérieure sombre à pore germinatif sub-apical. Il est caractérisé par l'ornementation particulière de la paroi sombre qui apparaît ponctuée de dépressions (= lacunes d'où *Lacunospora*) bien distinctes au microscope électronique à balayage (Cailleux & Melendez-Howell, 1970). Ce genre est considéré par Eriksson & Hawksworth (1986) comme synonyme d'*Apiosordaria* qui a des ascospores de morphologie similaire; il n'a pas fait jusqu'à présent l'objet d'études au microscope électronique à transmission.

La paroi de la très jeune ascospore de *L. stercoraria* (fig. 28) comporte une périspore recouverte d'une limitante externe faiblement réactive. Sa partie externe, d'épaisseur irrégulière, est hyaline et sa partie profonde très réactive, de texture granulaire. Au-dessous la paroi propre n'est pas encore différenciée.

Dans l'ascospore en maturation (fig. 29) la paroi est formée d'une couche unique, relativement mince et comportant une alternance de zones très réactives faiblement convexes vers l'extérieur et d'étroits sinus clairs. Cette couche provient du développement de la mince périspore interne, la périspore externe ayant disparu. Par la suite (fig. 30) les parties claires de la périspore interne, plus développées mais encore séparées du sporoplasme par une mince couche réactive, présentent une section triangulaire, à sommet dirigé vers l'épiplasme.

Quand l'ascospore approche de la maturité (fig. 31) une paroi propre s'est différenciée sous la périspore interne dont les aires claires sont devenues plus nombreuses et plus volumineuses, faisant parfois saillie dans l'épiplasme. La structure de la paroi se complique quand l'ascospore atteint sa maturité (fig. 32). D'une part une importante endospore se développe (seule sa partie externe a pu être observée, l'interne n'ayant pas été conservée lors des coupes, comme cela est fréquent en présence de structures cartilagineuses). D'autre part les caractères de la périspore se modifient: sa texture granuleuse devient plus grossière, les aires sombres s'étalent latéralement à leur sommet et confluent secondairement au-dessus des aires claires qui paraissent désormais vides. Enfin la paroi propre est masquée par de gros granules anguleux disposés irrégulièrement et probablement de nature pigmentaire.

La paroi ascosporale de *L. stercoraria* a donc, comme celle d'*Apiosordaria*, une ornementation d'origine périsporale, mais elle diffère de cette dernière par la présence d'une endospore, ce qui justifie la distinction des genres *Lacunospora* et *Apiosordaria*.

B. Ornementation d'origine non périsporale

1. Genre *Neurospora* (Sordariaceae, Sordariales)

Dans ce genre les ascospores, unicellulaires, sombres, ont une ornementation faite de bandes longitudinales saillantes plus ou moins interconnectées.

Au début du stade secondaire la paroi d'une jeune ascospore de *N. crassa* (fig. 33) comporte une périspore et une paroi propre. Dans la périspore, mince, la partie interne plus importante, transparente aux électrons, est recouverte d'une partie externe faiblement réactive, développée uniquement au niveau des sinuosités de la limitante externe. La paroi propre, assez épaisse, est à peine réactive (granulations extrêmement fines, plus abondantes près de la périspore et du plasmalemme sinueux).

Quand l'ascospore est un peu plus âgée (fig. 34), la périspore externe s'épaissit, l'interne demeure inchangée. Des différenciations apparaissent dans la paroi propre sous forme d'aires plus réactives de section grossièrement hémisphérique, à base faisant face au sporoplasme; les aires claires qui les séparent sont légèrement saillantes dans le sporoplasme. Un peu plus tard (fig. 35), la paroi propre s'est épaissie; les aires réactives y deviennent plus distinctes et à leur base une mince pellicule très claire relie entre elles les aires claires. Peu avant la maturation (fig. 36) la partie externe de la périspore est devenue presque indistincte et sa partie interne, toujours transparente, reste très peu épaisse. Dans la paroi propre les aires claires se sont rétrécies, tandis que les aires réactives s'affirment, contenant de petites différenciations conchoïdales dispersées plus nettement réactives; la pellicule claire au contact du plasmalemme est remplacée par un liseré réactif.

Quand l'ascospore est mûre (fig. 37), la partie externe de la périspore a disparu et sa partie interne reste hyaline et mince. Dans la paroi propre, de structure inchangée, la réactivité des aires sombres s'est renforcée, leur texture devenant grossièrement granuleuse. Une importante endospore se développe: sa partie externe, seule observée, est réactive, comme celle des exemples précédents. Lors de la libération de l'ascospore, les aires claires de la paroi propre se dissolvent, au moins en partie, tandis que les aires réactives persistantes constituent les bandes ornementales, plus ou moins confluentes, bien distinctes au microscope électronique à balayage (Cailleux, 1971).

L'architecture de la paroi ascosporale observée chez *N. crassa* est en accord avec celle qu'ont figurée Sussman (1966) et Byrne (1975) qui ont, de plus, vu l'endospore interne. Concernant le mode de formation de l'ornementation, l'interprétation proposée ici diffère de celle de Byrne (1975) mais concorde avec celles de Hohl & Streit (1975) et de Lafayette & Austin (1977): l'ornementation n'est pas d'origine périsporale mais elle se développe dans la paroi propre. Si l'aspect des coupes de paroi ascosporale de *Neurospora* rappelle celui, très fréquent et classique, des ascospores à ornementation périsporale, il s'agit en fait d'une convergence que prouve l'étude de l'ontogénèse de la paroi.

2. Le genre *Gelasinospora* (Sordariaceae, Sordariales)

Dans ce genre, les ascospores unicellulaires sombres sont pourvues de deux pores germinatifs opposés et ont une paroi ornementée de dépressions

(fovéoles). Elles ont été étudiées au microscope électronique à balayage (Melendez-Howell & Cailleux, 1969, 1975; Cailleux, 1971) mais non par transmission.

La paroi de la jeune ascospore de *G. tetrasperma*, espèce identique à l'espèce type ou certainement très proche, est analogue à celle de *Neurospora crassa*. Elle comporte (fig. 38) une paroi propre bien développée, d'aspect hétérogène (alternance d'aires claires et réactives), une mince périspore et une limitante externe faiblement onduleuse et réactive. Dans une ascospore en début de maturation (fig. 39) la paroi s'est fortement épaissie au niveau des aires claires de la paroi propre et celles-ci sont maintenant fortement saillantes dans le sporoplasme dont le contour est, par suite, fortement sinueux. Une pellicule réactive s'est développée à la base de la paroi propre. Entre les aires claires la paroi propre est très réactive et la périspore, claire, apparente.

Des stades plus âgés n'ont été observés que chez *G. santiflorii*, espèce différente mais proche de *G. tetrasperma*. Dans les ascospores en cours de maturation (fig. 40) la périspore demeure mince. Au-dessous, dans la paroi propre, les aires claires sont très saillantes dans le sporoplasme et les aires sombres, de faible épaisseur, s'étendent latéralement. Une importante endospore s'est différenciée: elle comporte une couche interne claire et une couche externe plus épaisse et sombre. Lorsque l'ascospore, mûre, est libérée (fig. 41), l'épaisseur de sa paroi est devenue presque uniforme sur toute la surface. La partie externe de l'endospore, très importante, cartilagineuse (très difficile à couper), se charge de nombreux granules réactifs probablement de nature pigmentaire. La périspore est complètement exfoliée et les saillies internes de la paroi propre forment alors paradoxalement des dépressions (= fovéoles) enchâssées dans l'endospore, tandis que les aires sombres sont mises en relief.

Dans le genre *Gelasinospora* l'ornementation de la paroi ascosporale est donc d'origine non périsporale, comme chez le *Neurospora*, mais les bandes ornementales confluent en un réseau très dense enchâssant les fovéoles.

IV - Les ascospores pourvues d'appendices

Les appendices caractérisant certaines ascospores peuvent être de deux types: les appendices primaires dérivent de l'une des cellules de l'ascospore, incomplètement développée et dont le contenu peut dégénérer en partie, tandis que les appendices secondaires sont formés par une expansion de la paroi.

Seuls des appendices secondaires se développent chez *Caudospora taleola* (Diaporthales *inc. sedis*): deux prolongent chacune des cellules de l'ascospore et deux ou trois autres se développent latéralement au niveau du septum médian (fig. 42). Quelle que soit leur position, ces appendices, en forme de doigt de gant, ont une origine périsporale et sont limités par l'ectospore (fig. 43). Sous la périspore, l'épispore opaque et l'endospore transparente entourent la totalité de l'ascospore; au contraire l'exospore, formée de globules opaques, de taille variable, est interrompue au niveau de chaque appendice. Cette exospore d'aspect granuleux est bien visible en microscopie à balayage (Rogers, 1984).

Un cas plus complexe d'ascospore pourvue d'appendices a été observé chez la Sordariale *Podospora anserina*, dont la paroi a été décrite plus haut. L'extrémité postérieure de l'ascospore porte (fig. 44) un appendice primaire digitiforme, vestige de la cellule ascosporale postérieure; sur celui-ci se développent latéralement des appendices secondaires, expansions irrégulières is-

sues de la périspore. Chez cette même espèce Beckett et al. (1968) décrivent également un appendice primaire postérieur et des appendices secondaires, tandis que chez *P. arizonensis* Alloway & Wilson (1972) n'observent que des appendices secondaires.

La diversité observée ici dans la nature des appendices de paroi ascosporale a déjà été illustrée en microscopie électronique chez quelques espèces d'Eupyrénomycètes. Ainsi Rogers & Stiers (1974) ont distingué, dans le genre *Rosellinia* (Xylariales, Xylariaceae) le cas de *R. mammiformis*, à appendices secondaires d'origine périsporale, et celui de *R. aquila* où chaque appendice secondaire forme un capuchon sur un appendice primaire, qui peut être lui-même double. Des appendices d'origine uniquement périsporale ont été observés chez des Eupyrénomycètes marins appartenant à l'ordre des Halosphaeriales (Lutley & Wilson, 1972a et b; Johnson, 1980; Porter, 1982; Johnson et al., 1987). Ils présentent une grande diversité morphologique et peuvent différer par leur contenu, toujours en rapport avec celui de la périspore d'origine. Ces appendices semblent donc ne pas avoir de valeur systématique significative: ils correspondent vraisemblablement à des adaptations particulières rendues possibles par la plasticité de la périspore.

CONCLUSION

Les observations sur les parois ascosporales de quelques Eupyrénomycètes rapportées dans ce travail ont permis de préciser leur organisation ultrastructurale et ont montré une grande diversité (fig. 45) puisqu'on a pu distinguer: des parois non ornementées, pourvues ou non d'une endospore, et des parois ornementées (ornementation formée à partir de la périspore ou de la paroi propre): par ailleurs, dans plusieurs genres les ascospores présentent des appendices, d'origine variable.

1. Cette diversité ultrastructurale n'est pas limitée aux exemples étudiés ici; elle est largement illustrée également par les données déjà acquises par d'autres auteurs. Dans tous les cas le plan structural fondamental schématisé par la figure 1 peut être retrouvé.

Chez les Sordariales le genre *Chaetomium* (Chaetomiaceae) présente des ascospores le plus souvent lisses (*C. semen-citrulli*, Millner et al., 1977; *C. brasiliense*, Rosing, 1982; *C. repens*, Figueras & Guarro, 1988) mais parfois verruqueuses (*C. thermophile*, Millner et al., 1977). Chez les espèces où plusieurs stades de développement ont été observés (Rosing, 1982; Figueras & Guarro, 1988) il semble que la périspore soit extrêmement mince et transitoire et qu'il n'y ait pas d'endospore.

Dans l'ordre des Xylariales, si la paroi de l'ascospore jeune de *Xylaria polymorpha*, étudiée par Rogers (1975), montre une structure à trois couches (épispore, périspore, ectospore), celle des ascospores adultes présente le maximum de complexité, avec cinq couches superposées, mais sans réalisation d'une ornementation: *Poronia punctata* (Stiers, 1974), *Daldinia concentrica* (Beckett, 1976a et b) et *X. longipes* (Beckett, 1979); en dépit de la difficulté d'interprétation des clichés, la présence d'une endospore paraît être de règle.

Chez l'Erysiphale *Sphaerotheca mors-uvae* (Erysiphaceae) étudiée par Martin et al. (1976) la paroi ascosporale semble dépourvue d'endospore et porteuse d'une ornementation d'origine périsporale; les clichés sont toutefois difficiles à interpréter.

Chez les deux espèces d'Onygénales Onygenaceae étudiées en microscopie électronique à transmission, la paroi, dépourvue d'endospore, comporte une exospore formée à la surface de l'épispore. Réduite à des dépôts aplatis, ne constituant pas une ornementation, chez *Thermoascus aurantiacus* (Ellis, 1981) l'exospore est par contre bien développée chez *Myxotrichum deflexum* (Rosing, 1985) et forme une ornementation, visible sous forme de bourrelets longitudinaux en microscopie électronique à balayage et présentant en coupe l'aspect d'une roue crantée.

Chez les Ophiostomatales la paroi ascosporale se rapproche du type décrit chez les Diatrypales et Diaporthales où la paroi primaire se transforme directement en une périspore à la base de laquelle se différencie tardivement une épispore; il n'y a ni endospore ni exospore. Malgré sa simplicité fondamentale, la paroi peut prendre des aspects très variés:

type lisse (*Ceratocystis stenoceras*, Garrison et al., 1979, *Ceratocystis ulmi*, Jeng & Hubbes, 1980, *Ophiostoma minus*, Van Wyk & Wingfield, 1990 et 1991a);

type faiblement ornementé avec ondulations irrégulières de la périspore (*Ophiostoma distortum*, Van Wyk & Wingfield, 1991a);

type à appendices donnant à l'ascospore une forme en chapeau caractéristique; ces appendices proviennent de la périspore, soit dans sa totalité (*Ophiostoma davidsonii*, Van Wyk & Wingfield, 1991b, et *O. cucullatum*, Van Wyk & Wingfield, 1991c) soit de sa seule couche externe (*Ceratocystis fimbriata*, Stiers, 1976 et *C. moniliformis*, Van Wyk & Wingfield, 1990, Van Wyk et al., 1991).

2. La diversité ultrastructurale de la paroi ascosporale des Eupyrénomycètes tient à plusieurs causes:

a) les couches constitutives de la paroi ascosporale sont diversement développées ou différenciées (fig. 45). Ceci est particulièrement net pour la périspore qui peut être réduite *(Neurospora)* ou importante *(Diatrypella, Coniochaeta)*, homogène *(Diatrypella, Coniochaeta)* ou hétérogène, sa partie profonde donnant alors des ornementations d'aspect divers *(Gnomonia, Hypoxylon, Lacunospora, Apiosordaria)*. C'est également le cas pour la paroi propre (= épispore), mince *(Diatrypella, Gnomonia, Hypoxylon)* ou épaisse *(Coniochaeta)* et présentant une hétérogénéité *(Lacunospora)* qui peut conduire à l'édification d'une ornementation *(Neurospora, Gelasinospora*, exospore du *Caudospora)*. Au niveau de l'endospore la diversité est plus réduite. Cette couche peut être absente ou quasi nulle, se confondant avec l'espace périplasmique. Quand elle est développée, sa partie externe, plus ancienne, peut se différencier de façon centripète; l'endospore apparaît alors subdivisée en deux parties, l'une externe, cartilagineuse, et l'autre interne. Cette dernière est importante seulement lorsque la vitesse de différenciation est lente.

b) des aspects similaires de la paroi peuvent résulter de la différenciation et du développement de couches structurales différentes. Ainsi (fig. 45) l'épaisseur de la paroi peut résulter essentiellement du développement de la paroi propre *(Neurospora)* ou de celui de l'endospore *(Sordaria, Podospora)*; l'ornementation ascosporale peut avoir une origine périsporale *(Apiosordaria, Gnomonia, Hypoxylon, Lacunospora)* ou provenir de la paroi propre *(Neurospora, Gelasinospora)* ou de l'exospore *(Caudospora)*. Ces convergences ne peuvent être décelées en microscopie photonique; les études au microscope électronique à balayage sont elles-mêmes insuffisantes: elle ne révèlent pas, par exemple, la différence d'origine de l'ornementation des *Neurospora* et des *Hypoxylon*. Seule la microscopie électronique à transmission permet de sui-

vre l'ontogénie de la paroi ascosporale et d'interpréter correctement la nature des structures observées.

c) alors qu'habituellement le stade secondaire de la paroi s'établit par différenciation d'une périspore à l'extérieur de la paroi propre, on constate chez plusieurs des genres étudiés ici que la paroi primaire, fondamentalement homogène, se transforme d'emblée en une périspore différenciée, antérieurement à l'établissement du stade secondaire (*Diatrype, Apiosordaria, Lacunospora*).

On peut admettre dans ce cas que la paroi ascosporale acquiert très précocement, dès le stade primaire, des potentialités de périspore et, par conséquent, des potentialités à l'ornementation. Or celle-ci favorise vraisemblablement la dissémination des ascospores et constitue ainsi un caractère adaptatif, indiquant que ces Eupyrénomycètes sont d'un type évolué.

3. L'étude de l'ultrastructure de la paroi ascosporale des Eupyrénomycètes suggère quelques remarques d'ordre systématique.

Tout d'abord au niveau du genre on observe souvent chez les espèces d'un même genre (*Neurospora, Sordaria, Gelasinospora*) une architecture analogue de la paroi ascosporale. Ce critère a été parfois utilisé dans la délimitation des genres; chez les Halosphaeriales le genre *Kohlmeyeriella* a été ainsi séparé de *Cucullospora* (Jones et al., 1983). Mais il n'en est pas tenu compte dans le genre *Hypoxylon* où pourtant les ascospores montrent une grande diversité (Rogers, 1979).

Au niveau de la famille on dispose en général de données sur trop peu de genres pour dégager des conclusions. Alors que chez les Xylariaceae par exemple les structures des parois ascosporales sont voisines chez les genres *Xylaria, Daldinia* et *Poronia*, chez les Sordariaceae par contre elles diffèrent entre le genre *Sordaria* d'une part, et les genres *Neurospora* et *Gelasinospora* d'autre part.

Pour ce qui est des ordres il faut remarquer d'abord que certains types de structure de la paroi ascosporale ne sont présents que dans certains groupes: ainsi l'endospore est absente chez les Diatrypales et les Diaporthales mais elle est présente chez les Sordariales. Mais il faut noter également que la structure de la paroi ascosporale peut être analogue dans des genres appartenant à des ordres différents. Ainsi (fig. 45), l'ornementation de la paroi a une même origine chez le *Gnomonia* (Diaporthales), l'*Hypoxylon* (Xylariales) et le *Lacunospora* (Sordariales).

Sans vouloir autrement généraliser, il est aussi remarquable qu'une ornementation de la paroi d'origine périsporale conduise à des structures pariétales très similaires chez des Discomycètes, parfois lichénisants, des Eupyrénomycètes et des Ascomycètes plectascés.

Chez les Eupyrénomycètes il apparaît donc qu'il n'y a pas de corrélation claire entre la structure de la paroi ascosporale et la systématique. Ceci est probablement dû, en partie du moins, à ce que la structure de la paroi ascosporale, dont les caractéristiques semblent régies par un petit nombre de gènes, peut être assez facilement influencée par l'action stressante des facteurs du milieu et de ce fait révéler des adaptations relativement récentes à de nouvelles conditions ambiantes (Bellemère et al., 1981; Melendez-Howell et al., 1987). Ainsi la présence d'une ornementation, favorable à la dispersion, et le développement d'une endospore, assurant un meilleur tampon du sporoplasme contre les températures extrêmes ou la sécheresse, pourraient affecter simultanément des lignées évolutives différentes caractérisées au moins en partie par la structure de

leurs asques, plus conservatrice. En d'autres termes la structure de la paroi ascosporale serait davantage un indicateur écologique qu'un indicateur systématique.

REMERCIEMENTS

Nous remercions J. Bidoux, H. Chacun, C. Fournigault, N. Jampsin et M.C. Malherbe pour leur précieuse et amicale collaboration technique, R. Cailleux (MNHN de Paris) pour la fourniture de diverses souches, et la Direction de l'E.N.S. Fontenay-Saint-Cloud pour diverses facilités accordées en vue de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

ALLOWAY J.M. and WILSON I.M., 1972 - Fine structure of spore degeneration in *Podospora arizonensis*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 58: 231-236.

BECKETT A., BARTON R. and WILSON I.M., 1968 - Fine structure of *Podospora anserina*. *J. Gen. Microbiol.* 53: 89-94.

BECKETT A., 1976a - Ultrastructural studies on exogenously dormant ascospores of *Daldinia concentrica*. *Canad. J. Bot.* 54: 689-697.

BECKETT A., 1976b - Ultrastructural studies on germinating ascospores of *Daldinia concentrica*. *Canad. J. Bot.* 54: 698-705.

BECKETT A., 1979 - Ultrastructure and development of the ascospore germ slit in *Xylaria longipes*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 72: 269-276.

BELLEMÈRE A., MELENDEZ-HOWELL L.M., NICOLAS A. et ROSSIGNOL J.L., 1981 - Etude ultrastructurale comparative du développement des ascospores chez la lignée sauvage et chez des mutants à ascospores "ceinturées" ou "albinos" de l'*Ascobolus immersus* Pers. ex Fr. *Cryptogamie, Mycol.* 2: 299-359.

BYRNE B.J., 1975 - Freeze-etch and thin section studies of *Neurospora crassa* ascospores. *Protoplasma* 84: 357-377.

CAILLEUX R., 1968 - Champignons stercoraux de République Centrafricaine. *Cah. Maboké* 6: 91-98.

CAILLEUX R. et MELENDEZ-HOWELL L.M., 1970 - La spore du *Lacunospora stercoraria* en microscopie électronique à balayage: pore germinatif et aspect superficiel, considérations taxonomiques. *Ann. Sci. Nat., Bot. et Biol. Vég.* 12ème série, XI: 409-420.

CAILLEUX R., 1971 - Recherches sur la mycoflore coprophile centrafricaine. Les genres *Sordaria, Gelasinospora, Bombardia* (Biologie - Morphologie - Systématique). *Bull. Soc. Mycol. France* 87: 461-626 + 27 pl.

CHADEFAUD M., 1944 - *Biologie des Champignons.* L'avenir de la Science, 19. Paris, Gallimard, 270 p.

CHADEFAUD M., 1960, *Les végétaux non vasculaires* (Cryptogamie). *In.* M. Chadefaud et L. Emberger, *Traité de Botanique Systématique.* Paris, Masson, I, XV + 1018 p.

ELLIS D.H., 1981 - Ultrastructure of thermophilic fungi. II. Ascus and ascospore development in *Thermoascus aurantiacus*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 76: 467-478.

ERIKSSON O.E. and HAWKSWORTH D.L., 1986 - An alphabetical list of the generic names of Ascomycetes. 1986. *Systema Ascomycetum* 5: 3-111.

ERIKSSON O.E. and HAWKSWORTH D.L., 1991 - Outline of the Ascomycetes. 1990. *Systema Ascomycetum* 9: 39-271.

FIGUERAS M.J. and GUARRO J., 1988 - Developmental morphology and fine structure of the ascoma of *Chaetomium repens*. *Nova Hedwigia* 47: 489-495.

FURTADO J.S. and OLIVE L.S., 1970 - Ultrastructure of ascospore development in *Sordaria fimicola*. *J. Elisha Mitchell* 86: 131-138.

GARRISON R.G., MARIAT F., BOYD K.S. and FROMENTIN H., 1979 - Perithecial ultrastructure and formation of ascospores of *Ceratocystis stenoceras* (Robak) C. Moreau. *Ann. Microbiologie* 130: 3-21.

GREENHALGH G.N. and EVANS L.V., 1968 - The developing ascospore wall of *Hypoxylon fragiforme*. *J. Royal Micr. Soc.* 88: 545-556.

GRIFFITHS H.B., 1973 - Fine structure of seven unitunicate Pyrenomycete asci. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 60: 261-271.

HACKETT C.J. and CHEN K.C., 1976 - Ultrastructure of developing ascospores in *Sordaria brevicollis*. *J. Bacteriol.* 126: 883-894.

HOHL H.R. and STREIT W., 1975 - Ultrastructure of ascus, ascospore and ascocarp in *Neurospora lineolata*. *Mycologia* 67: 367-381.

JENG R.S. and HUBBES M., 1980 - Ultrastructure of *Ceratocystis ulmi*. II. Ascogenous system and ascosporogenesis. *Eur. J. Forest Pathol* 10: 104-116.

JOHNSON R.G., 1980 - Ultrastructure of Ascospore appendages of marine Ascomycetes. *Bot. Mar.* 23: 501-527.

JOHNSON R.G., JONES E.B.G. and MOSS S.T., 1987 - Taxonomic studies of the Halosphaeriaceae: *Ceriosporopsis*, *Haligena*, and *Appendichordella* gen. nov. *Canad. J. Bot.* 65: 931-942.

JONES E.B.G., JOHNSON R.G. and MOSS S.T., 1983 - Taxonomic studies of the Halosphaeriaceae: *Corollospora* Werdermann. *Bot. J. Linn. Soc.* 87: 193-212.

LAFAYETTE F. and AUSTIN W.L., 1977 - The structure and development of the rib layer in *Neurospora* ascospores. *I.M.C. 2. Abstr.* Univ. Florida, vol. A-L, 204.

LUTLEY M. and WILSON I.M., 1972a - Development and fine structure of ascospores in the marine fungus *Ceriosporopsis halima*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 58: 393-402.

LUTLEY M. and WILSON I.M., 1972b - Observations on the fine structure of ascospores of marine fungi: *Halosphaeria appendiculata*, *Torpedospora radiata* and *Corollospora maritima*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 59: 219-227.

MAINWARING H.R., 1972 - The fine structure of ascospore wall formation in *Sordaria fimicola*. *Arch. Mikrobiol.* 79: 126-135.

MARTIN M., GAY J.L. and JACKSON G.V.H., 1976 - Electron microscopic study of developing and mature cleistothecia of *Sphaerotheca mors-uvae*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 66: 475-487.

MELENDEZ-HOWELL L.M. et CAILLEUX R., 1969 - Problèmes posés par la distinction et la valeur du pore germinatif chez les ascospores fovéolées en microscopie à balayage. *Ann. Sci. Nat., Bot. et Biol. Vég.* 10: 339-350.

MELENDEZ-HOWELL L.M. et CAILLEUX R., 1975 - Sur quelques aspects du pore germinatif ascosporal dans le genre *Gelasinospora* Dowding. *Bull. Soc. Mycol. France* 91: 105-116.

MELENDEZ-HOWELL L.M., BELLEMÈRE A. et ROSSIGNOL J.L., 1987 - Remarques à propos de l'ultrastructure d'ascospores "albinos" ou "granuleuses" de mutants d'*Ascobolus immersus* Pers. (gène b8). *Cryptogamie, Mycol.* 8: 269-288.

MILLNER P.D., MOTTA J.J. and LENTZ P.L., 1977 - Ascospores, germ pores, ultrastructure, and thermophilism of *Chaetomium*. *Mycologia* 69: 720-733.

PARGUEY-LEDUC A., 1967a - Recherches préliminaires sur l'ontogénie et l'anatomie comparée des Ascocarpes des Pyrénomycètes Ascohyméniaux. I. Notions générales. *Rev. Mycol.* 32: 57-68.

PARGUEY-LEDUC A., 1967b - Recherches préliminaires sur l'ontogénie et l'anatomie comparée des Ascocarpes des Pyrénomycètes Ascohyméniaux. II. Structure et développement des ascothécies. *Rev. Mycol.* 32: 259-277.

PORTER D., 1982 - The appendaged ascospores of *Trichomaris invadens* (Halosphaeriaceae) a marine ascomycetous parasite of the tanner crab, *Chionoecetes bairdi*. *Mycologia* 74: 363-375.

ROGERS J.D. and STIERS D.L., 1974 - Cytology of *Rosellinia mammiformis* and *R. aquila*. *Canad. J. Bot.* 52: 5-10.

ROGERS J.D., 1975 - *Xylaria polymorpha*. II. Cytology of a form with typical robust stromata. *Canad. J. Bot.* 53: 1736-1745.

ROGERS J.D., 1979 - The Xylariaceae: systematic, biological and evolutionary aspects. *Mycologia* 71: 1-42.

ROGERS J.D. and CANDOUSSAU F., 1982 - *Hypoxylon gillesii*, a new species with ornamented ascospores from Madagascar. *Mycotaxon* 15: 506-514.

ROGERS J.D., 1984 - *Caudospora taleola*: anamorph and systematic position. *Mycotaxon* 21: 475-484.

ROSING W.C., 1982 - Ultrastructure of ascus and ascospore development in *Chaetomium brasiliense*. *Mycologia* 74: 960-974.

ROSING W.C., 1985 - Fine structure of cleistothecia, asci, and ascospores of *Myxotrichum deflexum*. *Mycologia* 77: 920-926.

SPURR A.R., 1969 - A low viscosity Epoxy embedding medium for electron microscopy. *J. Ultrastruc. Res.* 26: 31-43.

STIERS D.L., 1974 - Fine structure of ascospore formation in *Poronia punctata*. *Canad. J. Bot.* 52: 999-1003.

STIERS D.L., 1976 - The fine structure of ascospore formation in *Ceratocystis fimbriata*. *Canad. J. Bot.* 54: 1714-1723.

SUSSMAN A.S., 1966 - Types of dormancy as represented by conidia and ascospores of *Neurospora*. *In*. M.F. MADELIN, *The fungus spore*. London, Butterworths, 235-257.

THIÉRY J.P., 1967 - Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. *J. Microscop.* 6: 987-1018.

VAN WYK P.W.J. and WINGFIELD M.J., 1990 - Ascospore development in *Ceratocystis sensu lato*. a review. *Bothalia* 20: 141-145.

VAN WYK P.W.J. and WINGFIELD M.J., 1991a - Ultrastructural study of ascoma and ascospore development in *Ophiostoma distortum* and *Ophiostoma minus*. *Canad. J. Bot.* 69: 2529-2538.

VAN WYK P.W.J. and WINGFIELD M.J., 1991b - Ultrastructure of ascosporogenesis in *Ophiostoma davidsonii*. *Mycol. Res.* 95: 725-730.

VAN WYK P.W.J. and WINGFIELD M.J., 1991c - Ascospore ultrastructure and development in *Ophiostoma cucullatum*. *Mycologia* 83: 698-707.

VAN WYK P.W.J., WINGFIELD M.J. and VAN WYK P.S., 1991 - Ascospore development in *Ceratocystis moniliformis*. *Mycol. Res.* 95: 96-103.

LÉGENDES DES FIGURES

Abréviations

ec: ectospore = limitante externe; *en:* endospore (*ene:* endospore externe; *eni:* endospore interne); *ep:* épispore (=paroi propre *pp*); *ex:* exospore; *ip:* paroi intermédiaire (?); *p:* périspore (*pe:* périspore externe, *pi.* périspore interne); *s:* sporoplasme.

Abbreviations:

ec: ectospore = investing membrane; *en:* endospore (*ene:* external endospore; *eni:* internal endospore); *ep:* epispore (=proper wall *pp*); *ex:* exospore; *ip:* intermediate wall (?); *p:* perispore (*pe:* external perispore; *pi:* internal perispore); *s:* sporoplasm.

Fig. 1: schéma synthétique de la paroi ascosporale faisant apparaître les équivalences de terminologie.

Fig. 1: Diagram of ascospore wall with equivalent terminologies.

Fig. 2-5: paroi ascosporale non ornementée à périspore développée. Contraste uranyle-plomb: fig. 2 et 4; technique de Thiéry: fig. 3 et 5. Fig. 2 et 3: très jeunes ascospores avec paroi primaire réduite à la périspore chez *Diatrypella quercina* (fig. 2) et *Diatrype disciformis* (fig. 3). Fig. 4 et 5: ascospores adultes avec paroi comportant de l'intérieur vers l'extérieur: l'épispore, la périspore à texture fibrillaire et l'ectospore, chez *Diatrype disciformis* (fig. 4) et *Diatrypella quercina* (fig. 5). Echelle 0,5 μm (fig. 2 et 5) ou 0,2 μm (fig. 3 et 4).

Fig. 2-5: smooth ascospore wall with developed perispore. Uranyl-lead staining: fig. 2 and 4; Thiéry's test: fig. 3 and 5. Fig. 2 and 3: very young ascospores; primary wall reduced to perispore. *Diatrypella quercina* (fig. 2) and *Diatrype disciformis* (fig. 3). Fig. 4 and 5: mature ascospores; wall comprising from inside to outside: epispore, fibrillar perispore and ectospore. *Diatrype disciformis* (fig. 4) and *Diatrypella quercina* (fig. 5). Scale: 0,5μm (fig. 2 and 5) or 0,2μm (fig. 3 and 4).

Fig. 6-8: paroi ascosporale non ornementée à périspore développée. Contraste uranyle-plomb: fig. 6; technique de Thiéry: fig. 7 et 8. Fig. 6: *Hercospora tiliae* et fig. 7: *Diaporthe oncostoma*; paroi réduite à une épispore et à une périspore peu développée limitée par l'ectospore. Fig. 8: *Leucostoma nivea*; épispore sinueuse et confluence des périspores de deux ascospores voisines. Echelle: 0,2 μm (fig. 6 et 7) ou 1 μm (fig. 8).

Fig. 6-8: smooth ascospore wall with developed perispore. Uranyl-lead staining: fig. 6; Thiéry's test: fig. 7 and 8. Fig. 6: *Hercospora tiliae* and fig. 7: *Diaporthe oncostoma*; wall reduced to epispore and scarce perispore with investing ectospore. Fig. 8: *Leucostoma nivea:* sinuous epispore and confluent perispores of two neighbouring ascospores. Scales: 0,2μm (fig. 6 and 7) or 1μm (fig. 8).

Fig. 9-13: paroi ascosporale non ornementée pourvue d'une endospore chez deux *Sordaria*: *S. fimicola* (fig. 9, 10 et 11) et *S. prolifica* (fig. 12 et 13). Technique de Thiéry. Fig. 9: paroi d'une jeune ascospore avec paroi propre, périspore à mince couche basale réactive et limitante externe faiblement sinueuse. Fig. 10 et 12: parois d'ascospores en maturation: paroi propre et périspore subdivisées, ébauche d'endospore. Fig. 11 et 13: parois d'ascospores mûres: endospore à deux couches. Echelle: 0,5 µm.

Fig. 9-13: smooth ascospore wall with endospore in two *Sordaria*: *S. fimicola* (fig. 9, 10 and 11) and *S. prolifica* (fig. 12 and 13). Thiéry's test. Fig. 9: young ascospore wall; proper wall, perispore bounded by a reactive thin basal layer and sinuous investing membrane. Fig. 10 and 12: walls of developing ascospores; splitted proper wall and perispore, incipient endospore. Fig. 11 and 13: mature ascospore walls: bilayered endospore. Scale: 0,5 µm.

Fig. 14-17: paroi ascosporale non ornementée pourvue d'une endospore chez *Podospora anserina*. Technique de Thiéry. Fig. 14: paroi d'ascospore en maturation avec périspore épaisse, paroi propre et endospore, toutes deux à 2 couches. Fig. 15: paroi d'ascospore un peu plus âgée avec érosion de la périspore externe. Fig. 16: paroi d'ascospore âgée; périspore interne seule conservée, paroi propre et endospore à deux couches. Remarquer la disposition régulière (hélicoïdale ?) dans l'endospore interne. Fig. 17: cas où l'endospore interne est exceptionnellement très développée. Echelle: 0,5 µm.

Fig. 14-17: smooth ascospore wall with endospore in *Podospora anserina*. Thiéry's test. Fig. 14: wall of developing ascospore; thick perispore and bilayered proper wall and endospore. Fig. 15: wall of an older ascospore, external perispore eroded. Fig. 16: mature ascospore wall: internal perispore preserved, bilayered proper wall and endospore. Notice the regular (helicoid ?) disposition in internal endospore. Fig. 17: exceptional expansion of internal endospore. Scale: 0,5 µm.

Fig. 18-20: paroi ascosporale non ornementée pourvue d'une endospore. Contraste uranyle-plomb. Fig. 18: jeune ascospore de *Coniochaeta ligniaria* à paroi épaisse comportant épispore, périspore et ectospore. Fig. 19: détail de la paroi d'une ascospore adulte de *Coniochaeta ligniaria*, avec endospore épaisse différenciée sous les autres couches. Fig. 20: détail de la paroi d'une ascospore adulte de *Gnomonia leptostyla* avec endospore, épispore et périspore contenant des plaques ornementales plus ou moins confluentes. Echelle: 0,5 µm (fig. 18) ou 0,25 µm (fig. 19 et 20).

Fig. 18-20: smooth ascospore wall with endospore. Uranyl-lead staining. Fig. 18: young ascospore in *Coniochaeta ligniaria*; thick wall comprising epispore, perispore and ectospore. Fig. 19: detail of mature ascospore wall in *Coniochaeta ligniaria*: thick endospore formed beneath the other layers. Fig. 20: detail of mature ascospore wall in *Gnomonia leptostyla*; endospore, epispore and perispore containing more or less confluent ornamental sheets. Scale: 0,5µm (fig. 18) or 0,25µm (fig. 19 and 20).

Fig. 21-24: paroi ascosporale ornementée chez *Hypoxylon fragiforme*. Contraste uranyle-plomb: fig. 22; technique de Thiéry: fig. 21, 23 et 24. Fig. 21: jeune ascospore avec périspore dérivée de la paroi primaire. Fig. 22: apparition de plaques ornementales dans la périspore. Fig. 23: détail de la paroi d'une ascospore plus âgée; ornementation en festons dérivant des plaques. Fig. 24:

détail de la paroi d'une ascospore adulte avec endospore, épispore et périspore dont la couche interne contient des masses oculiformes claires au sein de l'ornementation. Echelle: 0,5μm (fig. 21 et 22) ou 0,25μm (fig. 23 et 24).

Fig. 21-24: ornamented ascospore wall in *Hypoxylon fragiforme*. Uranyl-lead staining: fig. 22; Thiéry's test: fig. 21, 23 and 24. Fig. 21: young ascospore: perispore arising from primary wall. Fig. 22: ornamental perisporal sheets formation. Fig. 23: detail of an older ascospore wall; scallops arisen from ornamental sheets. Fig. 24: detail of mature ascospore wall; endospore, epispore and ornamented internal perispore. Scale: 0,5 μm (fig. 21 and 22) or 0,25 μm (fig. 23 and 24).

Fig. 25-27: paroi ascosporale à ornementation d'origine périsporale chez *Apiosordaria verruculosa* (cellule supérieure). Technique de Thiéry. Fig. 25: paroi d'une jeune ascospore réduite à la périspore (contenant des différenciations internes réactives) bordée par la limitante externe. Fig. 26: paroi d'une ascospore en début de maturation avec mince paroi propre sous la périspore: périspore interne à festons réactifs et périspore externe en guirlande claire. Fig. 27: paroi d'une ascospore proche de la maturité; ornementation constituée par les piliers réactifs de l'épaisse périspore; limitante externe distincte. Echelle: 0,5 μm.

Fig. 25-27: perisporal ornamentation of ascospore wall in *Apiosordaria verruculosa* (upper cell). Thiéry's test. Fig. 25: young ascospore wall reduced to perispore (reactive differenciation within) and investing membrane. Fig. 26: wall of developing ascospore; thin proper wall beneath perispore (internal part forms reactive scallops and external a clear garland). Fig. 27: wall of an almost mature ascospore; ornamentation constituted by reactive perisporal pillars beneath the investing membrane. Scale: 0,5μm.

Fig. 28-32: paroi ascosporale à ornementation d'origine périsporale chez *Lacunospora stercoraria*. Technique de Thiéry. Fig. 28: paroi d'une très jeune ascospore formée d'une périspore claire à base très réactive; espace périplasmique développé. Fig. 29: paroi d'ascospore en début de maturation; paroi sinueuse formée de la seule périspore très réactive entrecoupée de sinus clairs. Fig. 30: paroi d'ascospore un peu plus âgée; aires claires triangulaires remplaçant les sinus. Fig. 31: paroi d'ascospore proche de la maturation; mince paroi propre et périspore réactive contenant des aires triangulaires claires plus nombreuses et plus développées. Fig. 32: paroi d'ascospore en fin de maturation avec une endospore développée, une paroi propre très mince et une ornementation périsporale plus ou moins confluente. Echelle: 0,2 μm.

Fig. 28-32: perisporal ornamentation of ascospore wall in *Lacunospora stercoraria*. Thiéry's test. Fig. 28: very young ascospore wall; clear perispore with highly reactive basal layer over the periplasmic space. Fig. 29: wall of developing ascospore; highly reactive sinuous perispore with clear spots. Fig. 30: wall of an older ascospore; triangular clear areas replace spots. Fig. 31: wall of an almost mature ascospore; triangular clear areas are more numerous and developed in reactive perispore; thin proper wall. Fig. 32: mature ascospore wall; endospore, thin proper wall and confluence of perisporal ornamentation. Scale: 0,2 μm.

Fig. 33-37: paroi ascosporale à ornementation formée dans la paroi propre chez *Neurospora crassa*. Technique de Thiéry. Fig. 33: paroi d'une jeune

ascospore au début du stade secondaire avec une paroi propre assez développée, mal délimitée de la périspore mince à deux couches; limitante externe réactive. Fig. 34: paroi d'une ascospore en début de maturation; paroi propre épaisse avec aires plus réactives; périspore inchangée. Fig. 35: paroi d'une ascospore en cours de maturation; paroi propre importante en légère saillie dans le sporoplasme en dehors des aires sombres (futures ornementations); périspore inchangée. Fig. 36: paroi d'une ascospore proche de la maturité; paroi propre à base réactive et contenant des aires sombres plus développées; périspore inchangée. Fig. 37: paroi d'une ascospore peu avant sa libération; important développement des ornementations dans la paroi propre; la mince périspore n'est plus bistratifiée. Echelle: 0,2 μm (fig. 33 et 36) ou 0,5 μm (fig. 34, 35 et 37).

Fig. 33-37: ornamentation in proper wall of ascospore in *Neurospora crassa*. Thiéry's test. Fig. 33: young ascospore wall (early secondary stage); fairly developed proper wall not clearly separated from thin bilayered perispore; reactive investing membrane. Fig. 34: wall of developing ascospore; thick proper wall with reactive areas; unchanged perispore. Fig. 35: wall of an older ascospore; large proper wall weakly projects into sporoplasm outside dark areas (future ornamentation); unchanged perispore. Fig. 36: wall of an almost mature ascospore; enlarged dark areas and reactive basal layer in proper wall. Fig. 37: ascospore wall just before emission: large ornamentation in proper wall; thin unlayered perispore. Scale: 0,2 μm (fig. 33 and 36) or 0,5 μm (fig. 34, 35 and 37).

Fig. 38-41: paroi ascosporale à ornementation formée dans la paroi propre chez *Gelasinospora tetrasperma* (fig. 38 et 39) et *G. santiflorii* (fig. 40 et 41). Technique de Thiery. Fig. 38: paroi d'une jeune ascospore au stade secondaire; mince périspore peu distincte de la paroi propre bien développée. Fig. 39: paroi d'ascospore en début de maturation; paroi propre bien développée, réactive à sa base et formant d'importantes saillies claires dans le sporoplasme, alternant avec des plages faiblement réactives; périspore mince et claire. Fig. 40: paroi d'ascospore vers la fin de sa maturation; présence d'une importante endospore à deux couches, plus développée entre les saillies de la paroi propre dans le sporoplasme; mince périspore. Fig. 41: paroi d'ascospore mûre; endospore externe très importante entre les saillies de la paroi propre vers le sporoplasme (futures fovéoles de la paroi). La périspore a disparu. Echelle: 0,5 μm.

Fig. 38-41: ornamentation in proper wall of ascospore in *Gelasinospora tetrasperma* (fig. 38 et 39) and *G. santiflorii* (fig. 40 and 41). Thiéry's test. Fig. 38: young ascospore wall (secondary stage); thin perispore fairly distinct from large proper wall. Fig. 39: wall of developing ascospore; large proper wall with reactive basal layer and alternating prominent clear projections into sporoplasm and reactive areas; thin clear perispore. Fig. 40: wall of an older ascospore; bilayered endospore best developed between projections of proper wall into sporoplasm; thin perispore. Fig. 41: mature ascospore wall; very large external endospore between projections of proper wall into sporoplasm (future foveoli). Perispore disappeared. Scale: 0,5 μm.

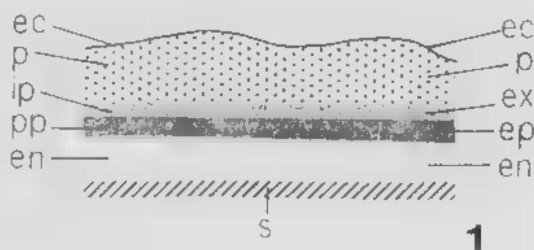
Fig. 42-44: ascospores à appendices. Contraste uranyle-plomb. Fig. 42: appendices secondaires chez *Caulospora taleola*. Fig.43: détail d'un des appendices terminaux d'origine périsporale et limité par l'ectospore. Noter les couches de la paroi ascosporale: endospore, épispore, exospore formée de globules opaque, périspore et ectospore. Fig. 44: appendice primaire portant des appendices

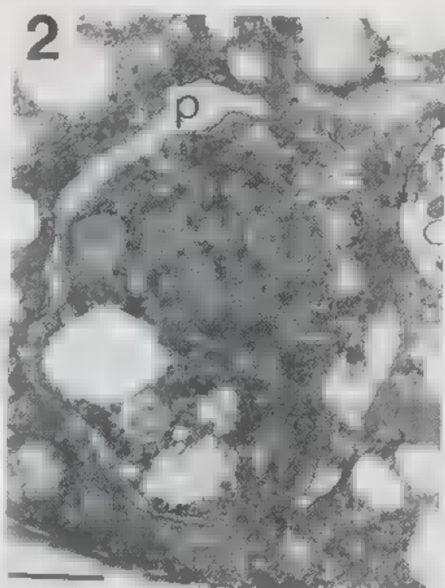
secondaires à l'extrémité d'une ascospore de *Podospora fimicola*. Echelle: 1μm (fig. 42 et 44) ou 0,5μm (fig. 43).

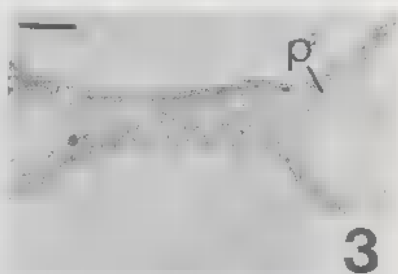
Fig. 42-44: appendaged ascospores. Uranyl-lead staining. Fig. 42: secondary appendages in *Caudospora taleola*. Fig. 43: detail of a terminal appendage; from perisporal origin it's bounded by ectospore. Notice the ascospore wall layers: endospore, epispore, exospore (dark globules), perispore and ectospore. Fig. 44: primary appendage bearing secondary appendages at the tip of *Podospora fimicola* ascospore. Scale: 1μm (fig. 42 and 44) or 0,5 (fig. 43).

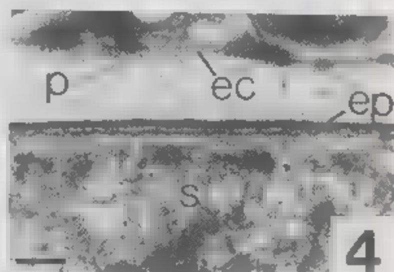
Fig. 45: schéma comparatif des divers types de paroi ascosporale chez quelques Eupyrénomycètes. Les figurés utilisés sont les mêmes que ceux de la figure 1. A: *Diatrypella quercina*; B: *Coniochaeta ligniaria*; C: *Apiosordaria verruculosa*; D: *Gnomonia leptostyla*; E: *Hypoxylon coccineum*; F: *Lacunospora stercoraria*; G: *Caudospora taleola*; H: *Gelasinospora santiflorii*.

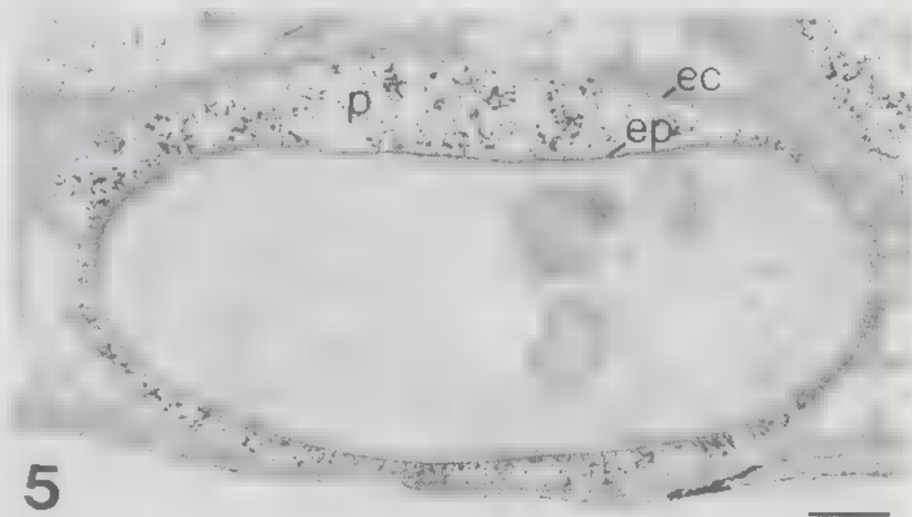
Fig. 45: comparative diagrams of different types of ascospore walls in various Eupyrenomycetes. Symbols used are the same as in figure 1. A: *Diatrypella quercina*; B: *Coniochaeta ligniaria*; C: *Apiosordaria verruculosa*; D: *Gnomonia leptostyla*; E: *Hypoxylon coccineum*; F: *Lacunospora stercoraria*; G: *Caudospora taleola*; H: *Gelasinospora santiflorii*.

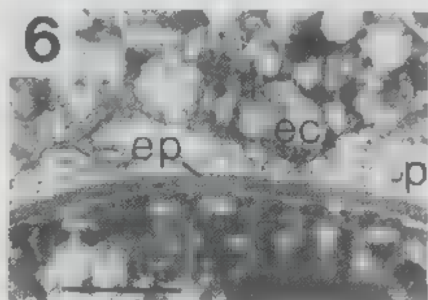


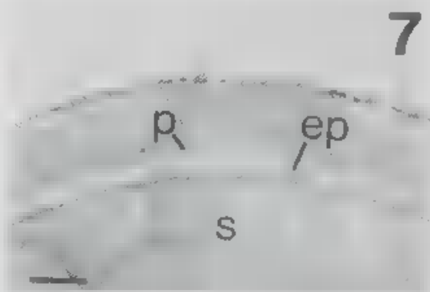

2
p


p
3


p
ec
ep
s
4

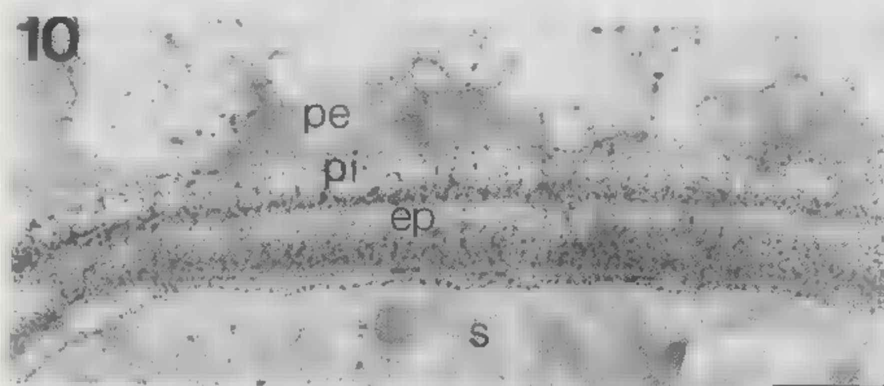

p
ec
ep
5

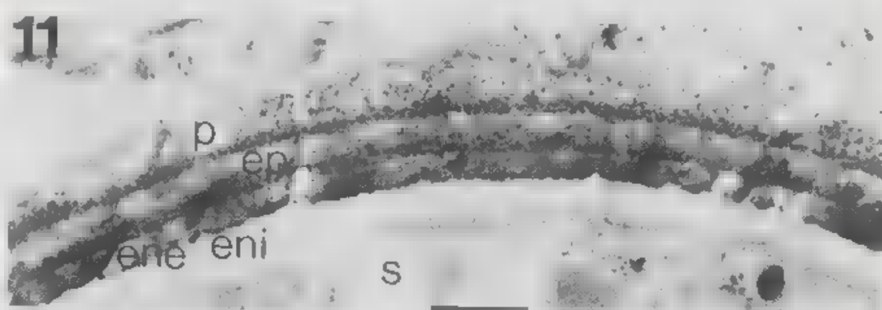

6
ep
ec
p

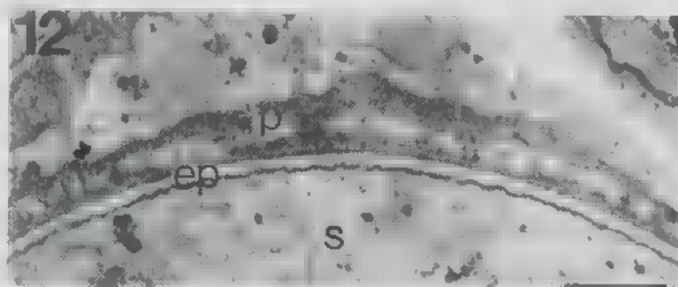

7
p
ep
s

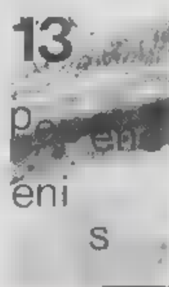

8
ep
p

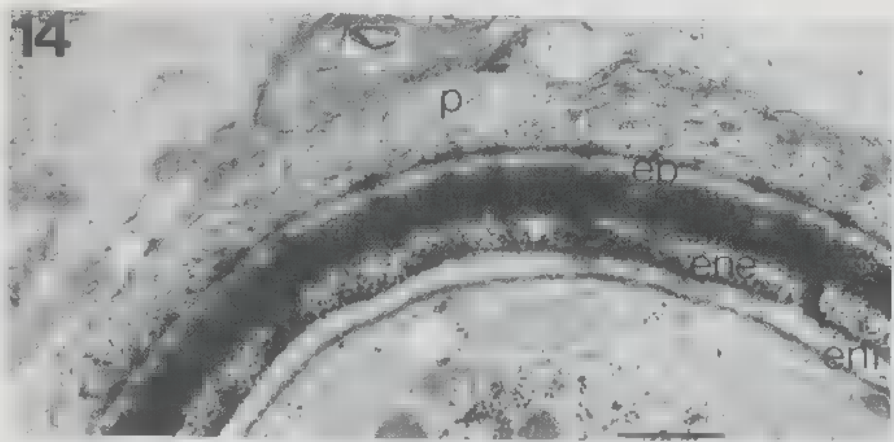

9
p
ep
s

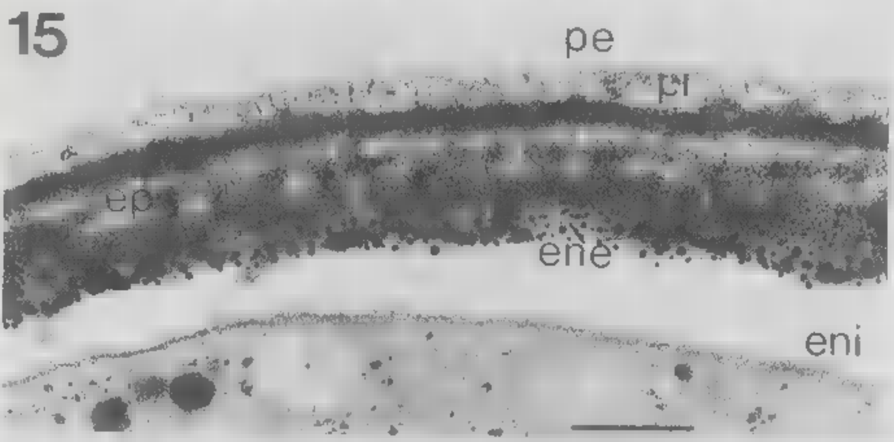

10
pe
pi
ep
s


11
p
ep
ene
eni
s

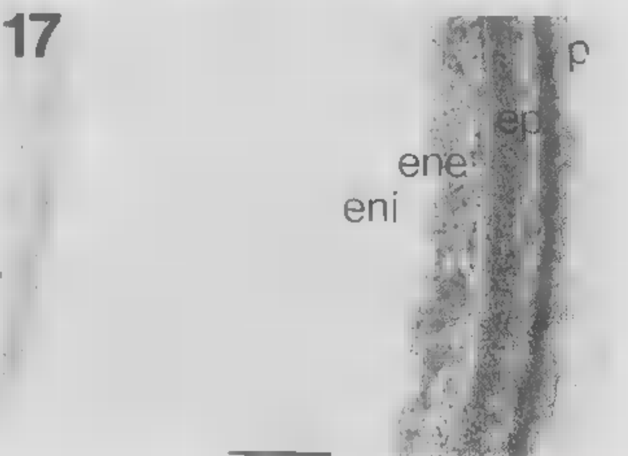

12
p
ep
s

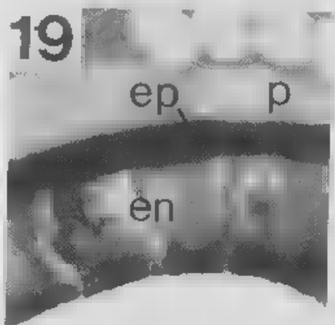

13
p
eni
s

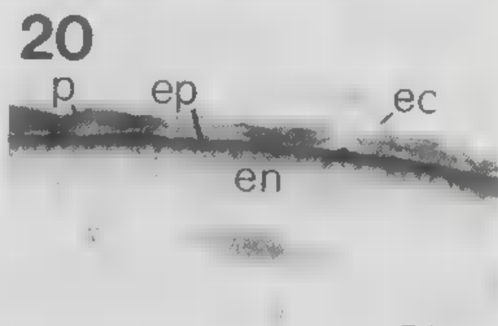

14
p
ep
ene
eni

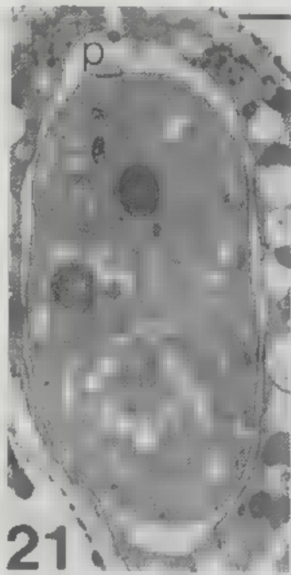

15
pe
pi
ep
ene
eni

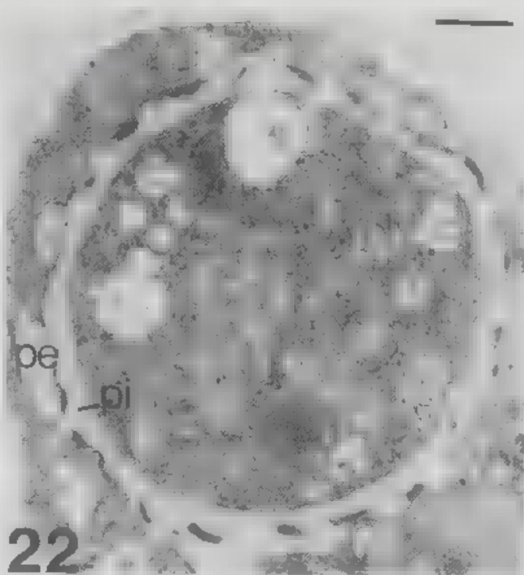

16
eni
ene
ep
p

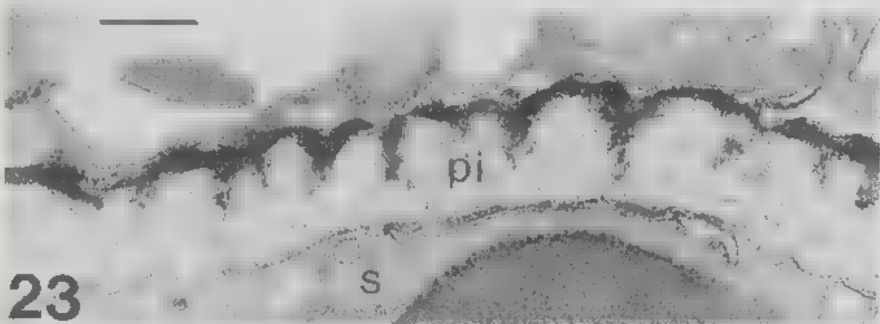

17
p
ep
ene
eni

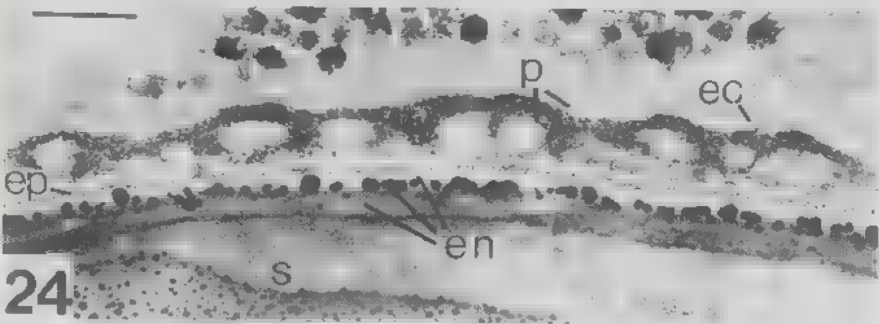

19
ep
p
en

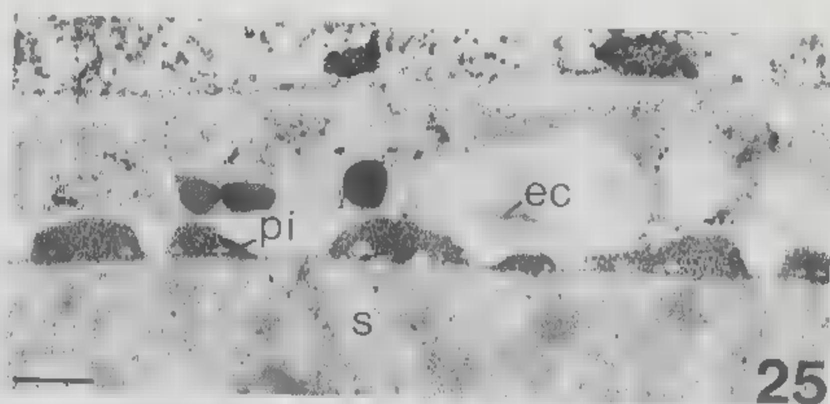

20
p
ep
ec
en

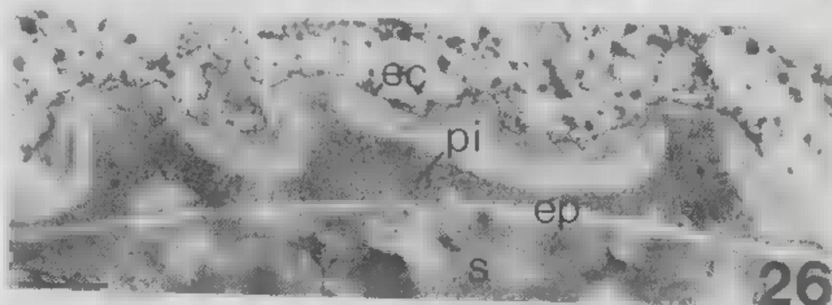

p
21

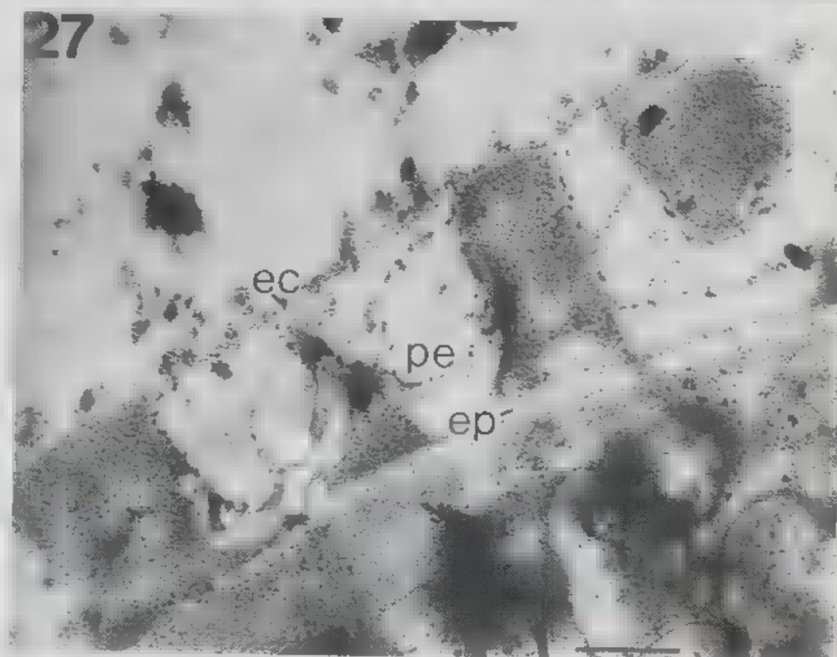

pe
pi
22

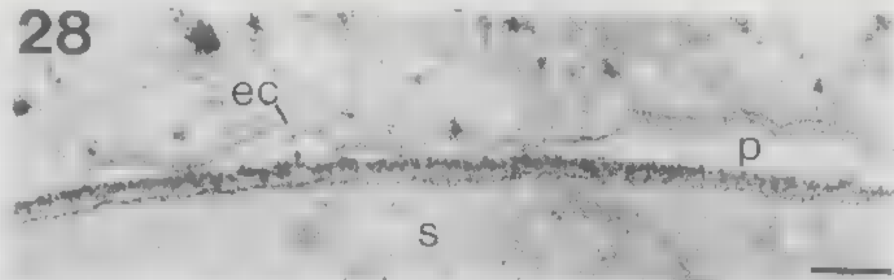

pi
s
23

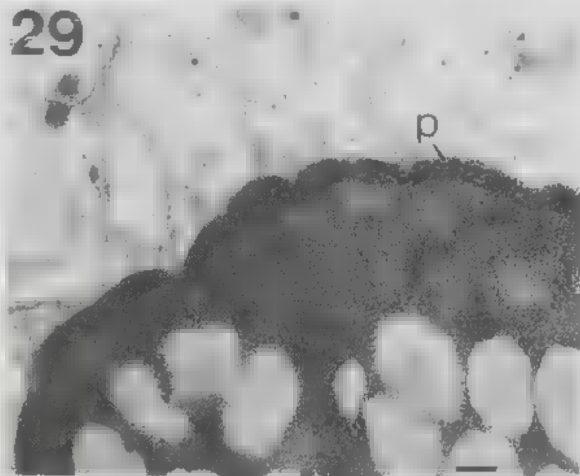

p
ec
ep
en
s
24

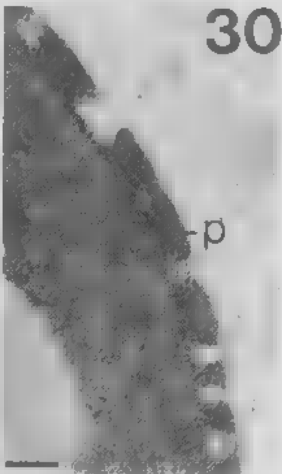

ec
pi
s
25

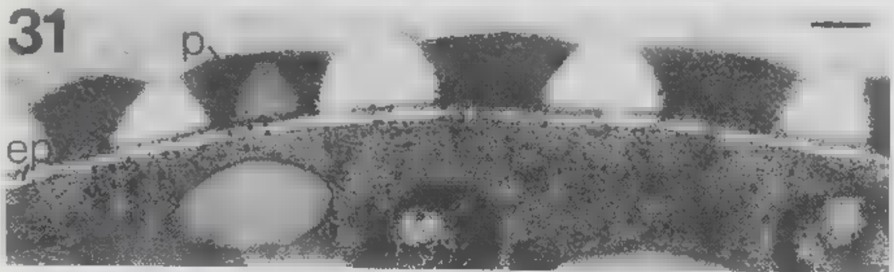

ec
pi
ep
s
26


27
ec
pe
ep

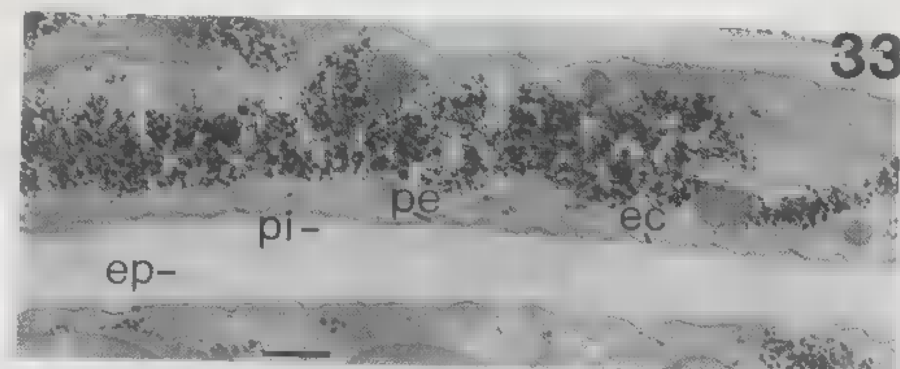

28
ec
p
s

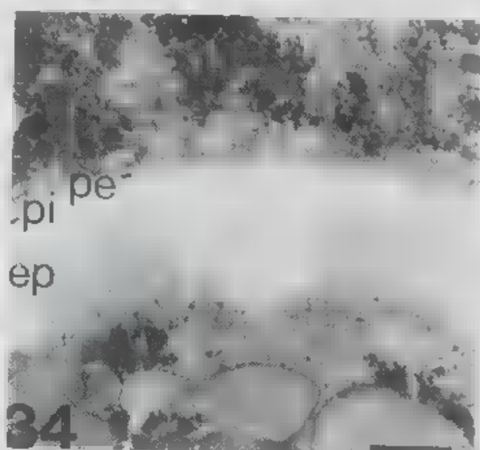

29
p

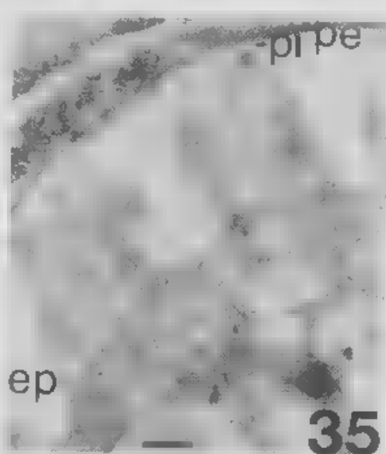

30
p

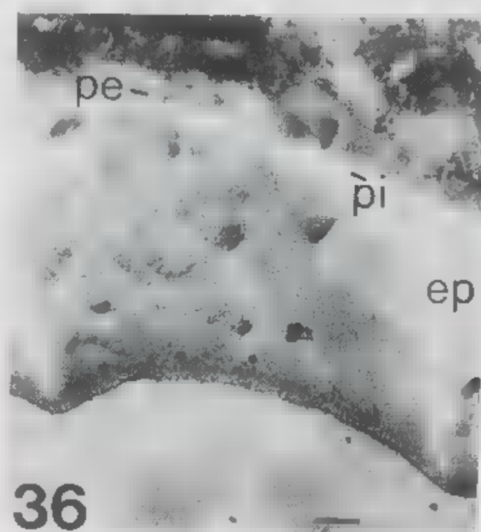

31
p
ep

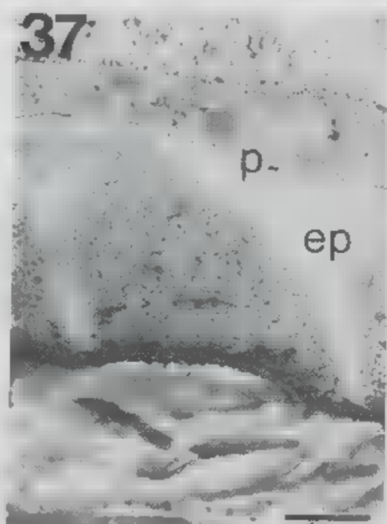

32
p
en
ep

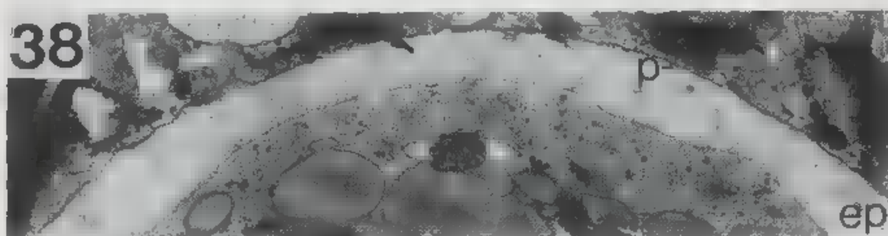

33
pe
pi
ec
ep

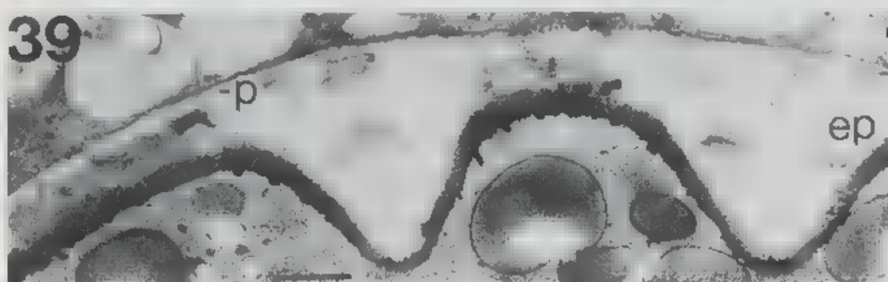

pe
pi
ep
34

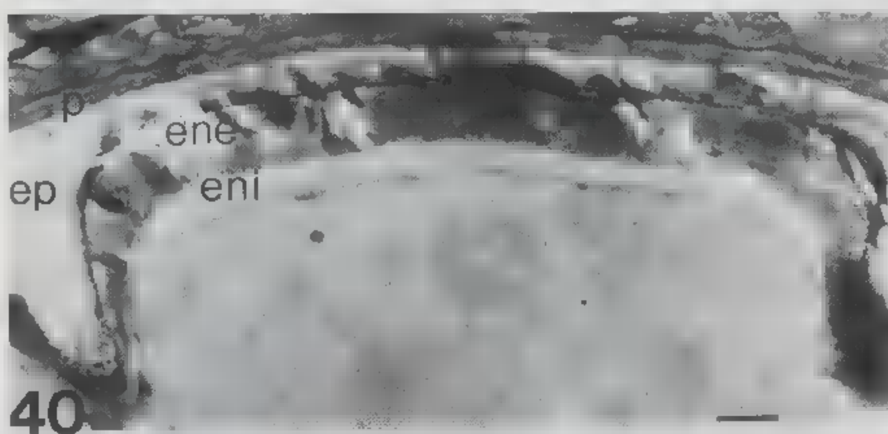

pi
pe
ep
35

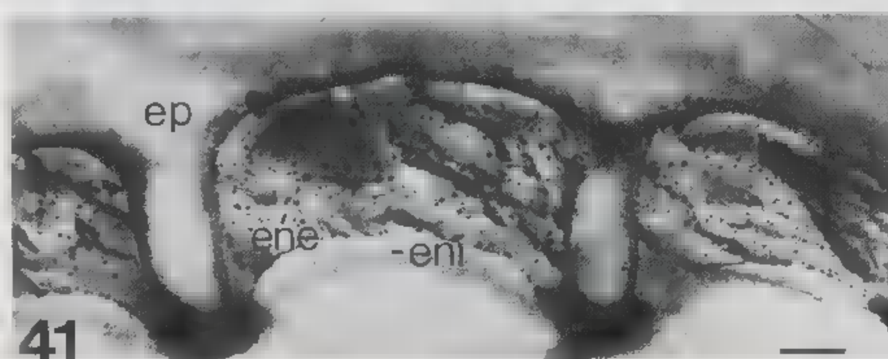

pe
pi
ep
36

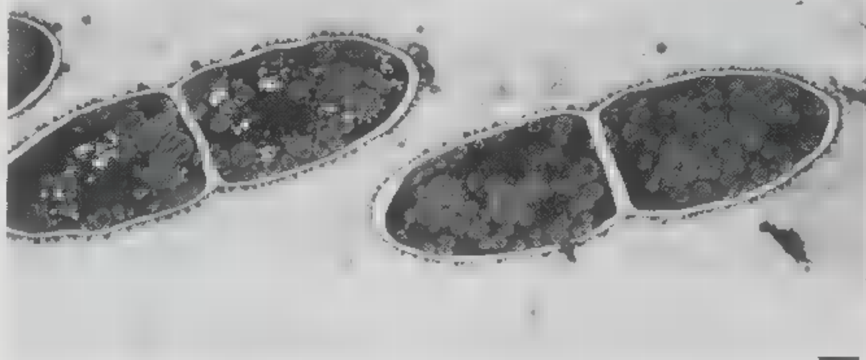

37
p
ep


38
p
ep

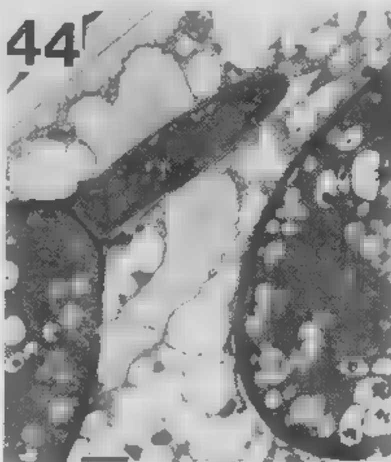

39
p
ep


p
ene
ep
eni
40


ep
ene
eni
41




43
ec
ex
p
ep
en


44

45		PAS D'ENDOSPORE	UNE ENDOSPORE
PAS D'ORNEMENTATION		A	B
UNE ORNEMENTATION	ORIGINE PERISPORALE	C	D E F
	ORIGINE NON PERISPORALE		G H

MYCENA ROSEA ET LE COMPLEXE *MYCENA PURA*

J. PERREAU, J. LAMBOURDIERE et M.C. BOISSELIER

C.N.R.S. - Laboratoire de Cryptogamie - M.N.H.N. -
12, rue de Buffon - F. 75005 PARIS

RÉSUMÉ - La distinction pressentie entre deux Mycènes ayant des caractères morphologiques très voisins - *Mycena rosea* et *Mycena pura* - est confirmée par l'analyse électrophorétique de neuf protéines à fonction enzymatique. Les résultats obtenus font également apparaître la variabilité biochimique existant parmi les basidiocarpes lilacins de *M. pura*, espèce où se manifeste une grande diversité pigmentaire.

ABSTRACT - Electrophoretic analysis used to test nine isoenzyme activities corroborates the already foreseen discrimination between the morphologically similar *Mycena rosea* and *Mycena pura*. Likewise biochemical variability is noted among lilaceous basidiocarps of *Mycena pura*, species with diversely pigmented basidiocarps.

MOTS CLÉS : *Mycena, Tricholomatales, Holobasidiomycotina*, analyse électrophorétique, variabilité enzymatique.

Sous la dénomination d'*Agaricus purus* Persoon, puis de *Mycena pura* (Persoon : Fries) Kummer, ont été décrits des champignons *(Holobasidiomycotina - Tricholomatales)* dont les basidiocarpes présentent des caractères morphologiques presque semblables, avec toutefois des teintes variées, allant non seulement du rose ou du lilacin, mais aussi du blanchâtre ou du citrin jusqu'au violacé foncé et au pourpre. Les formes roses ont plus particulièrement fait l'objet d'interprétations diverses au point de vue taxinomique puisqu'on les a tour à tour considérées comme variété de *M. pura* ou comme espèce à part. Ayant retracé (1985) l'historique des conceptions relatives aux Mycènes qui, dans le groupe *M. pura*, ont reçu l'épithète *rosea*, Maas Geesteranus distingue (1989) *Mycena rosea* (Bulliard) Gramberg de *M. pura* plus par l'aspect macroscopique ("...*Mycena rosea*, once shown, is easily distinguishable from *M. pura* already in the field...") que par les caractères microscopiques. Cependant, cet Auteur écrit : "... In view of the great variability of *Mycena pura*, it does not seem illogical to assume that *Mycena rosea* may be just another form or variety..."; il ajoute toutefois que la présence de substances toxiques différentes - muscarine chez l'un, composés psychotropes chez l'autre - paraît constituer un argument de poids en faveur de la séparation des deux taxons. L'étude par électrophorèse de protéines à fonction enzymatique, obtenues à partir des basidiocarpes, permet d'envisager une telle distinction à la lumière d'autres critères biochimiques.

Saprophytes, poussant en troupe, à terre, dans la litière de feuilles mortes, ces champignons appartiennent à la sous-section *Purae*, section *Calodontes* du genre *Mycena (Marasmiaceae)* et on y retrouve les principales caractéristiques de ces subdivisions. Leurs basidiocarpes, à développement

gymnocarpique, à silhouette collybioïde assez grêle, de taille moyenne (50-60 à 100 mm de hauteur), putrescibles, ont une odeur raphanoïde. Le stipe fistuleux, couvert à la base de fibrilles blanchâtres, porte un piléus campanulé ou conique arrondi, puis convexe plus ou moins étalé, finement strié à la marge, peu charnu, à revêtement humide, hygrophane. L'hyménophore est constitué de lamelles horizontales, sinuées-adnées, souvent veinées, anastomosées-gaufrées dans le sinus interlamellaire, de teinte pâle, à arête concolore ou plus claire. Les spores sont ellipsoïdes, à paroi lisse, mince et amyloïde.

Comparé aux différentes formes de *M. pura*, *M. rosea* se reconnaîtrait à son piléus d'un diamètre en général plus grand (supérieur à 50 mm), à sommet non déprimé, d'un rose vif, rose mauve ou rose violacé, jaunissant au centre. Au lieu de blanchâtre à rose pâle, la teinte des lamelles irait du rose pâle au rose lilacé, avec une arête blanche et non concolore, tandis que le stipe resterait peu coloré, blanc ou lavé de rose pâle, jaunâtre en bas. Alors que les dimensions sporales sont proches [7,4 - 8,1 - (9,2) x 3,4 - 4,9 - (5,6) µm dans le groupe *M. pura*, 6,7 - 9,0 x 4,5 - 5,6 µm pour *M. rosea*], la largeur et la forme [jusqu'à 36 µm - nettement plus sphéropédonculée, pour *M. rosea*] des cheilocystides, apparaîtraient plus déterminantes.

Quinze échantillons ont été cueillis - bien développés mais en bon état de fraîcheur -, en automne 1991, dans la forêt de Fontainebleau (F. 77), sur terrain siliceux, parmi les feuilles mortes de hêtre (*Fagus silvatica* L.) principalement. Numérotés de 187 à 201, provenant chacun de stations différentes réparties dans trois domaines (Rocher Long, Franchard, Gros Fouteau) du massif forestier, les six premiers à piléus rose (à peu près K.* 3D/28D brillant - vers S.* 155 - proche de M.* 11 A 5), lamelles rosées et stipe blanc jaunissant - teinté de rose chez le n° 188 - correspondent à *M. rosea*. Les neuf autres spécimens peuvent être rapportés à *M. pura*; ils présentent une pigmentation lilas rosé ou mauve pâle (K. 578 B; 553 C; 571; 572 - S. 10; 25; 45; 650 - M. 15 A 2; 14 B 3/4 environ), accentuée jusqu'au violacé brunâtre (vers K. 562/568 - S. 104 ou 43 - M. 11 C 5 environ) sur le piléus et le stipe. Les basidiocarpes 194 et 197 se montrent plus rose violacé tandis que le n°193, à cheilocystides clavées, larges de 12 - 16 µm, présente une coloration générale vieux rose (K. 17/22 - vers S. 84 - vers M. 10 B 4) (rosée sur les lamelles) susceptible de le faire considérer sur le terrain comme appartenant à *M. rosea*. Il faut noter aussi que, avec l'âge ou l'humidité, toutes ces teintes roses, lilacées ou violet purpurin passent normalement au beige rosâtre ou au brunâtre violacé.

Bien que le mycélium de ces champignons puisse être cultivé à partir de la germination des spores ou par bouturage de l'hyménophore (Oddoux, 1955), les essais réalisés sur milieu de Hagem amélioré ne s'avèrent pas suffisamment performants lorsqu'il s'agit de la réalisation d'électrophorèses. Pour chaque exemplaire conservé après la récolte une quinzaine d'heures à 4°C, un secteur de 200 - 250 mg découpé dans le piléus est donc broyé en tampon tris-glycine (4, 95 M, pH 8,3) - mercaptoéthanol (0, 34 %) en vue de la préparation de l'extrait protéique. Des quantités équivalentes de protéines sont ensuite soumises à une migration électrophorétique verticale en gel de polyacrylamide

---

* K.: KLINCKSIECK P. & VALETTE T., 1908 - *Code des couleurs*. Paris, P. Klincksieck, 86 p.
S.: SEGUY E., 1936 - *Code universel des couleurs. Encyclopédie Pratique du Naturaliste*. Paris, Lechevalier, 48 pl.
M.: KORNERUP A. & WANSCHER J.H., 1967 - *Methuen Handbook of colour*. London, Methuen & C°, 2nd ed., 244 p.

(prémigration 2,5%; migration 7%). Neuf révélations enzymatiques ont été testées: estérases, isocitrate-déshydrogénase, malate-déshydrogénase, glutamate-oxaloacétate-transaminase, peroxydases, phosphatases acides, glutamate-déshydrogénase, malico-enzyme et alcool-déshydrogénase (Boisselier-Dubayle, 1988; Hofman, 1988).

Tous les zymogrammes obtenus indiquent une nette différence dans les résultats entre les six premiers spécimens et les neuf autres (les n°193 et 200 se singularisant toujours par rapport aux sept autres échantillons du même groupe). Les profils observés en ce qui concerne les estérases, l'isocitrate-déshydrogénase et la malate-déshydrogénase se montrent les plus significatifs (fig. 1). On remarque non seulement une certaine homogénéité parmi les souches nommées *M. rosea*, mais également une variabilité évidente chez celles rattachées à *M. pura*. Pour ces dernières, trois profils se distinguent nettement par la révélation de l'isocitrate-déshydrogénase. Ils permettent de regrouper:

1) les souches 196 (basidiocarpe lilacin grisâtre), 194 et 197 (rose violacé), 195 et 201 (violacé);

2) les souches 198 et 199 (basidiocarpe violacé assez soutenu);

3) les souches 193 (basidiocarpe vieux rose) et 200 (violacé brunâtre).

Ces trois groupes se retrouvent à la lecture des profils malate-déshydrogénase et estérases (les plus polymorphes). Enfin, les profils de la malate-déshydrogénase soulignent l'existence de deux types électrophorétiques parmi les exemplaires de *M. rosea* étudiés: 187, 190 et 191 d'une part, 188, 189 et 192 d'autre part.

Nos premières observations relatives à la variabilité enzymatique chez les Mycènes à lamelles pâles de la sous-section *Purae* permettent bien d'appuyer l'individualité, par rapport à un complexe *Mycena pura* diversement pigmenté, d'un ensemble que, selon Maas Geesteranus, on peut appeler *Mycena rosea* (Bulliard) Gramberg. Ces différences d'ordre enzymatique viennent corroborer celles déjà découvertes à propos des substances vénéneuses et signalées par Krieglsteiner & Schwöbel (1982). En effet, Heim (1963) relate l'intoxication "... assez caractéristique du type psychotropique..." subie par V.H. Etienne en 1959 à la suite de l'ingestion de 40 échantillons frais de *M. pura*. Un peu plus tard, la présence de muscarine chez *M. rosea* est mise en évidence par Kubička & Veselký (1978) [la mention *Mycena rosea* (Bull.) ex Saccardo & Dalla Costa étant toutefois inexacte puisque les deux Auteurs italiens se réfèrent à *Mycena rosella* - cf. Maas Geesteranus, 1985].

Dès avant la fin du XVIIIème siècle, la Mycène rose a été parfaitement représentée par Bulliard, sous le nom évocateur d'Agaric couleur de rose, sur la planche 162 (1783 - 84) de l'Herbier de la France (reprise dans l'Histoire des champignons de la France) choisie comme lectotype du taxon par Maas Geesteranus (1985). Pourtant, la légende de cette planche, de même que celle de la planche 507, insistant sur la variété des formes et des couleurs, s'applique plutôt à *M. pura*. D'autres analyses biochimiques permettront sans doute de mieux comprendre l'organisation du complexe *M. pura* et éventuellement les relations entre ses représentants dans les pays tempérés et ceux, très nombreux, qui viennent en régions tropicales (Corner, 1986).

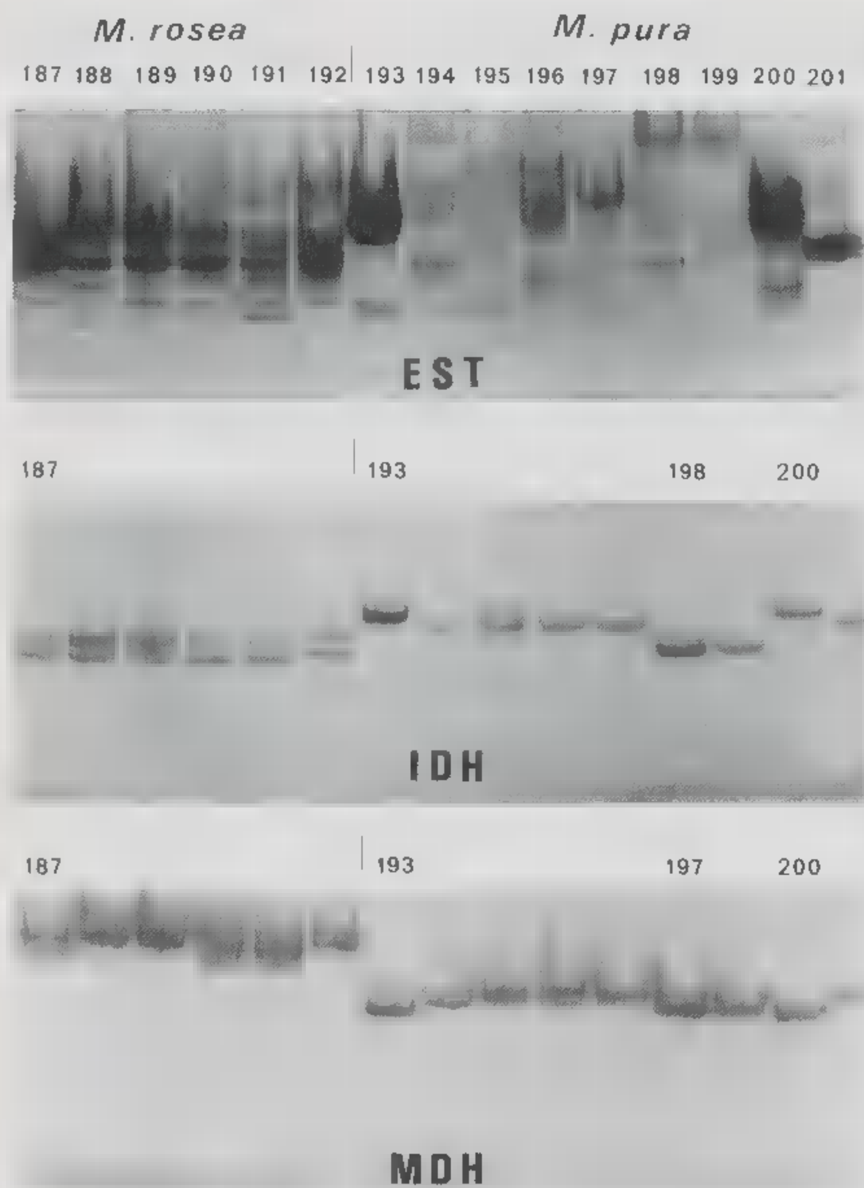


Fig. 1 - Zymogrammes des estérases (EST), de l'isocitrate-déshydrogénase (IDH) et de la malate-déshydrogénase (MDH) mettant en évidence la distinction entre *Mycena rosea* et *Mycena pura*.

Fig. 1 - Electrophoretic patterns for esterases (EST), isocitrate-dehydrogenase (IDH) and malate-dehydrogenase (MDH) showing the differences between *Mycena rosea* and *Mycena pura*.

BIBLIOGRAPHIE

BOISSELIER-DUBAYLE M.C., 1988 - Etude du polymorphisme enzymatique chez *Plagiochasma rupestre* (Forst.) Steph. et *Mannia androgyna* (L.) Evans. *Cryptogamie, Bryol. Lichénol.* 9: 283-296.

CORNER E.J.H., 1986 - The tropical complex of *Mycena pura*. *Bot. Soc. Edinburgh, Transactions, 150th Anniv. suppl.*, 61-67.

GILLET C.C., 1878 - *Les Champignons (Fungi, Hymenomycetes) qui croissent en France.* Paris, J.B. Baillière, 828 p.

HEIM R., 1963 - *Les Champignons toxiques et hallucinogènes.* Paris, Boubée & Cie, 328 p.

HOFMAN A., 1988 - Starch gel electrophoresis: a tool for studying the phylogenetic systematics and population genetics of mosses. *In*: J.M. Glime, *Methods in Bryology*. Japan, Hatt. Bot. Lab.: 353-358.

KRIEGLSTEINER G.J. & SCHWÖBEL H., 1982 - *Mycena diosma sp. nov.* und der *Mycena pura* Formenkreis in Mitteleuropa. *Z. Mykol.* 48: 25-34.

KUBIČKA J. & VESELSKÝ J., 1978 - *Mycena rosea* (Bull.) ex Sacc. et Dalla Costa ist giftig. *Česka Mykol.* 32: 167-168.

KÜHNER R., 1938 - *Le genre Mycena Fries. Encycl. mycol.* Paris, Lechevalier, 710 p.

MAAS GEESTERANUS R.A., 1985 - Studies in Mycenas 148-167. *Proc. Kon. Ned. Akad. Wetensch.* C. 88, 47-62.

MAAS GEESTERANUS R.A., 1989 - Conspectus of the Mycenas of the Northern Hemisphere - 13. Sections *Calamophilae* and *Calodontes*. *Ibid.* 92: 477-504.

ODDOUX L., 1955 - *Recherches sur les mycéliums secondaires des Homobasidiés en culture pure: Morphologie, cytologie, exigences alimentaires.* Thèse, Faculté des Sciences, Lyon, 338 p.

Source : MNHN, Paris

ANALYSES BIBLIOGRAPHIQUES

COLE Garry T. and HOCH Harvey C., 1991 - *The fungal spore and disease initiation in plants and animals.* N.Y. and London, Plenum Press. 555p. ISBN 0-306-434 54-7.

L'ensemble des articles contenus dans cet ouvrage porte sur l'étude des phases préliminaires de la pathogenèse des champignons chez les plantes et les animaux. L'objectif des éditeurs est de démontrer la communauté d'approche dans cette recherche sur les interactions champignons-plantes et champignons-animaux.

Les chapitres sont groupés en quatre thèmes correspondant aux différentes étapes de l'invasion: I: Fixation de la spore et début de l'invasion, II: Activité de la spore et pathogenèse, III: Réponse de l'hôte, IV: Aspect moléculaire de l'initiation de la maladie.

Le point crucial dans l'initiation d'une maladie fongique est la fixation de la spore sur le tissu de l'hôte. Quel que soit le domaine dans lequel ils travaillent, les spécialistes sont d'accord sur le fait qu'il ne s'agit pas d'un simple accolement mais que sont produites au niveau des spores, un certain nombre de substances chimiques (enzymes, glycoprotéines, polysaccharides...) ou de structures adhésives puis pénétrantes. Les huit premiers chapitres montrent bien le parallélisme des approches et la similitude des méthodes expérimentales utilisées dans les deux types de pathologies (rouilles, dermatophytes et *Candida*).

Les principales barrières à l'invasion par les champignons sont la cuticule pour les plantes et l'épithélium pour les vertébrés. La production d'enzymes hydrolysants est mise en évidence chez certains pathogènes, associés à la pénétration des cuticules et épithélium (cutinases extracellulaires chez *Fusarium solani f. sp. pisi, Alternaria alternata, Colletotrichum graminicola*, enzymes protéolytiques, estérases, chitinase et lipase chez *Metarrhizium anisopliae*).

Seuls les dermatophytes peuvent attaquer un épiderme kératinisé intact. La dégradation de la kératine et des protéines associées a été mise en évidence *in vitro* mais cette activité est encore peu démontrée *in vivo*. Les autres pathogènes traversent les épithéliums à la faveur d'un appauvrissement accidentel en kératine. La nécessité de l'isolement et de la caractérisation de ces enzymes - clefs (facteurs de virulence) et des inhibiteurs de ces enzymes *in vivo* est encore commune aux deux domaines. Elle fait apparaître que les recherches à venir doivent porter sur les bases moléculaires de la synthèse et de l'émission des produits en cause dans le système hôte-parasite.

Bien qu'il y ait des différences claires dans la nature de la réponse animale ou végétale aux phases précoces de l'invasion par le champignon, notre connaissance sur la façon dont le champignon vainc ou évite ces défenses est encore rudimentaire. On connaît par ailleurs bien certaines structures de pénétration hautement spécialisées comme la formation d'haustorium chez *Erysiphe graminis* et les céréales hôtes et les réactions cellulaires de celles-ci.

Ainsi un certain nombre de points, d'ordre fondamental, restent encore à préciser dans les mécanismes d'actions et réactions d'agression et de défense hôte-parasite.

Le développement des techniques de biologie moléculaire (DNA recombinant) est un nouveau volet de la recherche dans les domaines de la pathologie médicale et végétale. La possibilité d'obtenir des sondes pour évaluer les distances entre pathogènes et non pathogènes, pour étudier l'épidémiologie, est bien développée et prometteuse sur un plan pratique et fondamental. Pour les auteurs, l'avenir de la recherche passe par au moins trois approches: la régulation des gènes, le transfert de gènes de pathogénicité et l'étude de mutants.

L'étude des gènes de pathogénicité relève d'une technologie empruntée à celle des levures et en cours d'adaptation aux champignons filamenteux, surtout chez *Neurospora crassa* et *Aspergillus nidulans* comme modèles mais aussi chez quelques pathogènes (*Cochliobolus sp., Bremia lactucae*). L'avant dernier chapitre constitue une intéressante revue générale des techniques utilisées dans ce domaine. Ici encore on peut noter que l'étude de la pathologie fongique animale et végétale suivent les mêmes voies de recherche.

Cet ouvrage, qui pourrait être hétérogène par la diversité de spécialisation des auteurs, réussit à présenter une approche homogène de l'initiation des maladies fongiques. Elle permettra au lecteur d'appréhender la question de façon globale et de bénéficier des résultats obtenus dans des spécialités mycologiques souvent sans communication.

M.F. Roquebert

SNEH B., BURPEE L. and OGOSHI A., 1991 - *Identification of Rhizoctonia species.* St Paul, Minnesota, USA. APS Press, 133 p. ISBN 0-89054-123-X.

Les *Rhizoctonia* représentent un groupe de champignons très important en pathologie végétale principalement, mais aussi comme saprophytes ou mycorrhizes des orchidées ou autres plantes. Cette vaste répartition d'organismes d'intérêt économique non négligeable, a conduit à un grand nombre de publications à travers le monde. Cependant la classification et l'identification des *Rhizoctonia* est complexe. La monographie qui est présentée ici veut être, modestement, une introduction à la taxonomie, à l'identification, aux groupes d'anastomoses et aux techniques utilisées dans l'étude des *Rhizoctonia*.

La description originale du genre par de Candolle (1815) était si globale "sclérotes de texture uniforme portant des hyphes ramifiées, associées aux racines de différentes plantes" que bien d'autres champignons sans relation avec les *Rhizoctonia* ont été inclus dans le genre. Plusieurs auteurs ont effectué des mises au point, principalement sur la définition de *R. solani* (Parmeter & Witney, 1970). En 1987, Moore utilisant le critère de la structure des septa et des pores dans les hyphes des téléomorphes a mis en évidence leur appartenance à plusieurs groupes systématiques: Ascomycètes, Ustomycètes, Holo- et Hétérobasidiomycètes. Il s'en suivit une révision nomenclaturale qui conduit, logiquement, Moore à placer, par exemple, les anamorphes de *Thanatephorus* (groupe *R. solani*) dans le genre *Moniliopsis* Ruhland. Tout en reconnaissant le bien fondé de cette nouvelle conception, les auteurs gardent le nom *Rhizoctonia* en raison de son implantation très ancienne dans le domaine de la phytopathologie et de sa large utilisation. L'hétérogénéité du genre n'est cependant pas discutable.

Après cette introduction taxonomique, les auteurs proposent un chapitre détaillé sur les méthodes d'isolement, d'identification (coloration des noyaux, fusion des hyphes, induction des téléomorphes) et de conservation des souches de *Rhizoctonia*. Un autre chapitre porte sur la morphologie descriptive de ces organismes avant que ne soient proposées les clefs cytomorphologiques des ana- et téléomorphes et les descriptions des groupes d'anastomose d'espèces bi- et multinucléées. Pour les espèces analysées (*R. solani, zeae, oryzae, repens*) il semble qu'il y ait corrélation entre les possibilités d'anastomoses et les séquences de bases de l'ADN.

Une importante bibliographie (14 pages) accompagne cet ouvrage qui se termine par un index des taxons: espèces reconnues, synonymes, espèces douteuses et téléomorphes.

Malgré l'hétérogénéité des *Rhizoctonia* et la relative difficulté de mise en oeuvre des fusions hyphales avec des souches types, qui n'est pas à la portée de tous les phytopathologistes, cet ouvrage a le mérite de faire une synthèse claire des méthodes d'identification et de proposer une classification pratique de ce groupe de champignons.

M.F. Roquebert

HERRERA J.R., 1992 - *Fungal cell wall: Structure, synthesis and assembly.* Boca Raton, Florida, USA, CRC Press Inc., 248p. ISBN 0-8493-6672-0.

L'auteur est un mycologue spécialiste de la paroi fongique, de sa formation et de sa structure ainsi que de la régulation, du développement et de la différenciation des champignons.

Profitant de son expérience en la matière, il propose ici un ouvrage de synthèse couvrant en 10 chapitres les aspects structuraux, biochimiques et fonctionnels de la paroi dont l'importance dans la protection de la cellule, et sa différenciation morphologique n'est plus à démontrer.

Le premier chapitre expose la composition chimique générale des parois: méthodes d'isolement et d'analyse, revue des principaux composants: polysaccharides, lipides, protéines... Suivent deux chapitres sur l'évolution de la composition chimique au cours du développement et l'organisation, au niveau ultrastructural, des différents composants. Dans une suite assez peu logique, l'auteur revient sur l'étude détaillée des glucanes, chitine et chitosane, glycoprotéines, abondamment développée en 3 chapitres bien documentés où sont abordés la structure, la biosynthèse, le rôle spécifique de chacun d'eux.

Les chapitres suivants sont plus originaux. Ils exposent les résultats actuels des recherches sur la synthèse intracellulaire des composants puis de leur acheminement et assemblage. On est frappé par le fait que, dans le schéma général des différentes étapes de cet assemblage, bon nombre restent suivies d'un point d'interrogation. Par exemple on ne sait encore exactement à quel niveau cellulaire commence et se termine la synthèse de la chitine, où est initiée la synthèse des glucanes etc. Les expériences, les résultats et les hypothèses actuelles sur ces points sont cependant exposés en détail. La synthèse et le transfert des protéines paraissent mieux connus. La plupart sont transférées à travers la cellule, aussitôt que produites par les ribosomes liés au réticulum endoplasmique rugueux. Après début de glycosylation à la face interne de ce dernier, elles sont véhiculées par les systèmes membranaires (appareil de Golgi) et les vésicules sécrétoires vers l'extérieur du cytoplasme où elles sont associées à la paroi.

Les mécanismes de croissance et d'extension de la paroi cellulaire sont abordés au dixième et dernier chapitre. L'utilisation de la fixation par le froid, en microscopie électronique, a permis de lever des doutes sur l'organisation structurale du cytoplasme aux points de synthèse pariétale et de mettre en évidence des structures propres aux fonctions d'accompagnement et de direction telles que des microfilaments en région apicale et des microvésicules disposées de façon linéaire vers la membrane plasmique. Une corrélation est établie entre la distribution de l'actine et la polarisation de la croissance pariétale. Enfin les courants électriques, ioniques et de pH trouvés dans les zones de croissance (gradient de Ca+ et effet énergétique de l'ATP conjugués) expliquent en partie la progression axiale des hyphes.

Cet ouvrage, assez personnalisé, est une excellente synthèse sur le sujet. Chaque chapitre est l'objet de réflexions, d'analyse de résultats expérimentaux, de conclusions, d'hypothèses et de questions. La présentation est peut-être un peu dense, avec peu d'illustrations ou de tableaux récapitulatifs, mais une bibliographie très riche (environ 1000 références) enrichit chaque chapitre. Il sera très utile aux enseignants et aux chercheurs entreprenant une recherche dans ce domaine.

M.F. Roquebert

WHIPPS J.M. and LUMSDEN R.D., 1989 - *Biotechnology of Fungi for Improving Plant Growth.* Symposium of the British Mycological Society held at the Univ. of Sussex, Sept. 88. Cambridge University Press, 303p. ISBN 0-521-38236-X.

Le corps de cet ouvrage comprend les treize articles présentés lors d'un colloque organisé par le Comité des Biotechnologies de la British Mycological Society, à l'Université de Sussex. Les vingt-huit auteurs de ces documents synthétiques intégrant les observations les plus récentes pour chacun des sujets abordés, travaillent dans des institutions de recherches de pointe en France, au Royaume-Uni et en Amérique du Nord.

Les textes reproduits passent en revue les multiples utilisations des champignons dans le domaine de l'amélioration de la croissance des plantes vasculaires. Ils analysent également les paramètres commerciaux susceptibles d'accroître assez rapidement la commercialisation des préparations d'origine fongique. L'utilisation des champignons pour le contrôle des mauvaises herbes en culture agricole intensive est devenue, de nos jours, une pratique courante avec des dimensions commerciales. De même, des produits prometteurs, également d'origine fongique, commencent à apparaître sur le marché; ces derniers serviront à lutter contre les nématodes parasites des plantes, les champignons et les insectes phytopathogènes.

Le rôle des champignons dans la stimulation du développement des plantes vasculaires, soit directement par production de métabolites secondaires, soit par le biais d'hormones de croissance, est également analysé en profondeur. Enfin, une attention particulière est accordée aux progrès technologiques accomplis dans les domaines de la sélection, la culture et les modes de formulation commerciales des produits d'origine fongique, en rapport avec la pluralité des missions affectées à ces microorganismes.

Les informations contenues dans cet excellent ouvrage seront, sans conteste, fortement utiles aux enseignants et chercheurs s'intéressant à la mycologie, la phytopathologie, la botanique, la foresterie et l'entomologie. Les sujets abordés concernent un domaine où des progrès marquants sont attendus

et cela en raison des efforts intensifs déployés par les scientifiques et les utilisateurs dans leur poursuite de l'examen de nouvelles technologies et possibilités ayant pour objectif l'amélioration de la croissance des plantes vertes.

J. Mouchacca

TRESCOL F., 1992 - *Cortinaires: diagnoses. Clés.* 4 volumes. Alès, France, Edition Mycologique Alésienne, C. Epinat, 7 quai Jean Jaurès, Alès, 508p. ISBN 2-9506800.

Diagnoses - Fascicule 1: Cortinaires visqueux et index général. Fascicule 2: Cortinaires non visqueux.

Clés - Fascicule 3: Cortinaires visqueux. Fascicule 4: Cortinaires non visqueux.

INTERNATIONAL MYCOLOGICAL INSTITUTE - Catalogue of the culture collection, 10th edition 1992. Kew, U.K., CAB International.

Filamentous fungi, yeasts and plant pathogenic bacteria.

o

o o

Le 3ème Congrès de la Société Française de Phytopathologie se tiendra à Dijon les 7, 8 et 9 Décembre 1993 (M. C. Alabouvette - INRA, Laboratoire de recherche sur la flore pathogène du sol, 17 rue Sully, BP 1540, 21034 Dijon - France).

The third Congress of the "Société Française de Phytopathologie" will be held at Dijon from December 7 to 9, 1993 (Mr C. Alabouvette - INRA, Laboratoire de recherches sur la flore pathogène du sol, 17 rue Sully, BP 1540, 21034 Dijon - France).

Commission paritaire 16-1-1986 - N° 58611 - Dépôt légal 3e trimestre 1992 - Imprimerie F. Paillart
Sortie des presses le 30 septembre 1992 - Imprimé en France
Éditeur : A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames)
Président : R. Baudoin ; Secrétaire : D. Lamy
Trésorier : J. Dupont ; Directeur de la publication : H. Causse

CRYPTOGAMIE

LE PÉRIODIQUE FRANÇAIS CONSACRÉ A LA CRYPTOGAMIE

CRYPTOGAMIE est un périodique édité par l'A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), dont le siège est au Laboratoire de Cryptogamie du Muséum National d'Histoire Naturelle. Les chercheurs de tous pays y publient leurs travaux en français, allemand, anglais, espagnol et italien, après accord des Comités de Lecture constitués de spécialistes de réputation internationale.

CRYPTOGAMIE propose trois sections:

Cryptogamie, Algologie
Cryptogamie, Mycologie
Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

Chaque section publie 4 numéros par an (tirage: 450 exemplaires).

THE FRENCH JOURNAL DEVOTED TO CRYPTOGAMY

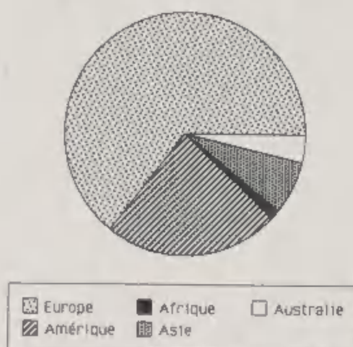
CRYPTOGAMIE is a periodical published by A.D.A.C. (Association des Amis des Cryptogames), settled at Laboratoire de Cryptogamie, Muséum National d'Histoire Naturelle. Research workers from the whole world publish their papers in French, German, English, Spanish and Italian, after acceptation by a selection commettee that comprises experts of international renown.

CRYPTOGAMIE offers to its subscribers three sections:

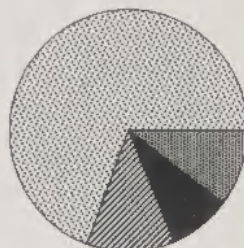
Cryptogamie, Algologie
Cryptogamie, Mycologie
Cryptogamie, Bryologie-Lichénologie

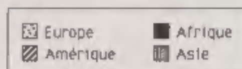
Each section publishes 4 numbers a year (printing: 450 ex.).

Diffusion de CRYPTOGAMIE

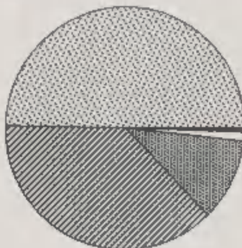


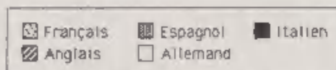
Origine des 453 articles publiés de 1986 à 1991





Répartition des articles publiés de 1986 à 1991 selon la langue





Source : MNHN, Paris

SOMMAIRE

Cryptogamie, Mycol. 1992, 13 (3): 149-257